

PCTWORLD INTELLECTUAL PRO
International

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER

WO 9605510A2

(51) International Patent Classification 6 :

G01N 30/92, B01L 3/00, G01N 27/30

A2

(11) International Publication Number:

WO 96/05510

(43) International Publication Date:

22 February 1996 (22.02.96)

(21) International Application Number: PCT/IB95/00723

(22) International Filing Date: 8 August 1995 (08.08.95)

(30) Priority Data:

9416002.5

8 August 1994 (08.08.94)

GB

(71) Applicant (for all designated States except US): CANADIAN BIOCONCEPTS, INC. [CA/CA]; 1969-B Keating Cross Road, Saanichton, British Columbia V8M 2A4 (CA).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ALCOCK, Susan [GB/GB]; The Granary, Uphoe Manor Farm, Harrold Road, Lavendon, Olney, Bucks MK46 4HX (GB). WHITE, Stephen [GB/GB]; 23 Normandy Close, Kempston, Bedford MK42 8TR (GB). TURNER, Anthony [GB/GB]; 8 Brook End, North Crawley, Bedfordshire MK16 9HH (GB). SETFORD, Steven [GB/GB]; c/o T., J. Setford, 50 Barnards Hill, Marlow, Bucks SL7 2NZ (GB). TOTHILL, Ibtisam [GB/GB]; 4 Thrift View, Bedford Road, Cranfield, Beds MK43 0HA (GB). DICKS, Jon [GB/GB]; 8 Mountfield Close, Newport Pagnell, Bucks MK16 0JE (GB). STEPHENS, Sarah [GB/GB]; 67 Bolingbroke Road, Stoke, Coventry CV3 1AP (GB). HALL, Jennifer [GB/GB]; 4 Partridge Piece, Cranfield, Beds MK43 0BP (GB).

WARNER, Philip [GB/GB]; 15 Victoria Street, Wolverton, Milton Keynes MK12 5HG (GB).

(74) Agents: STUART, Ian, Alexander et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London WC2B 6HP (GB).

(81) Designated States: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

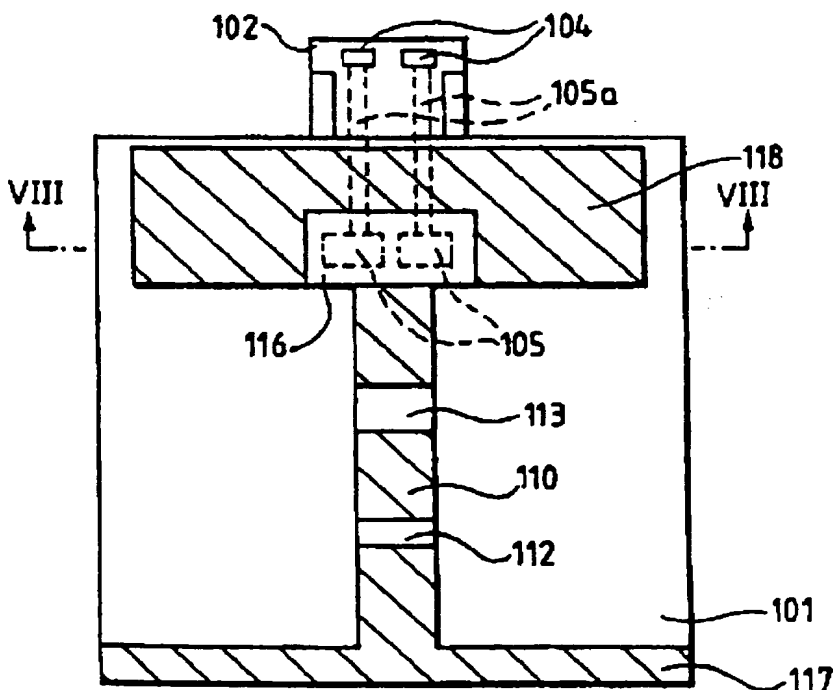
Published

Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

(54) Title: PRINTED FLUID TRANSPORT DEVICES

(57) Abstract

A backing sheet (101) is provided with a pattern of pathways (131, 132, 133) of e.g. silica or cellulose by a printing process (e.g., screen printing). There may be multiple pathways leading from an eluant application region (117) to a detection zone (116) and thence to a waste reservoir (118). Different pathways may have different fluid traversal times because they differ in length and/or material (e.g., nitrocellulose for slow traversal and fibrous cellulose for rapid traversal by an aqueous liquid). Thus analyte and reagents deposited at depots (112, 113) on different pathways are sequentially delivered to the detection zone. Reagents may be applied by printing. The detection zone may have an electrode assembly (105), also applied by printing, for detecting the effects of analyte.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-503848

(43) 公表日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 27/416

27/327

識別記号

F I

G 0 1 N 27/46

27/30

3 3 6 G

3 5 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 78 頁)

(21) 出願番号 特願平8-507170
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 8月8日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 2月10日
 (86) 国際出願番号 P C T / I B 9 5 / 0 0 7 2 3
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 0 5 5 1 0
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 2月22日
 (31) 優先権主張番号 9 4 1 6 0 0 2 . 5
 (32) 優先日 1994年8月8日
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 カナディアン バイオコンセプト, インコーポレイティド
 カナダ国, プリティッシュ コロンビア
 ブイ8エム 2エー4, サーニクトン,
 キーティング クロス ロード 1969-ビー
 (72) 発明者 アルコック, スーザン
 イギリス国, バッキンガムシャー エムケ
 ー46 4エイチエックス, オルネイ, ラベ
 ンドン, ハロルド ロード, アフォー マ
 ノー ファーム, ザ グラナリー (番地なし)
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 印刷された液輸送デバイス

(57) 【要約】

裏材シート(101)に、印刷方法(例えば、スクリーン印刷)により例えば、シリカ又はセルロースの一定パターンの経路(131, 132, 133)を提供する。溶出体適用領域(117)から検出ゾーン(116)そしてその後廃リザーバー(118)への多経路運搬が存在することができる。異なる経路は、異なる液移動時間をもつことができる。なぜなら、それらは、長さ及び/又は材料において相違するからである(例えば、水性液体による遅い移動のためにはニトロセルロース、そして速い移動のためには繊維状セルロース)。従って、異なる経路上のデポジット(112, 113)にデポジットされたアナライトと試薬は、逐次的にその検出ゾーンにデリバリーされる。試薬は、印刷により適用されることができる。検出ゾーンは、アナライトの効果を検出するために、同じく印刷により提供される電極アセンブリー(105)をもつことができる。

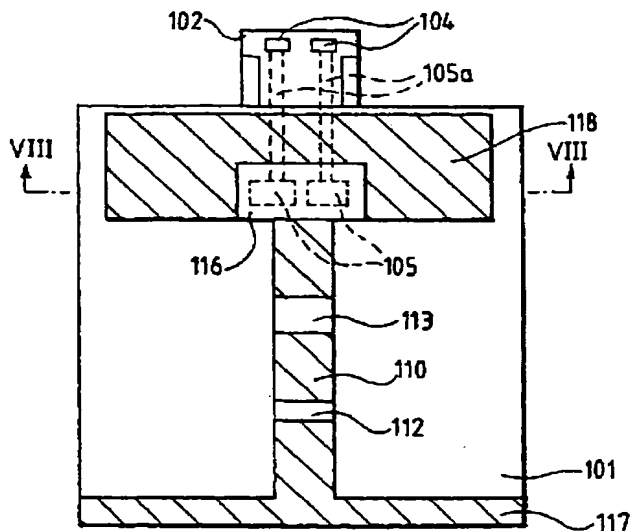


Fig. 7.

【特許請求の範囲】

1. 裏材シート、及びそれを通して液が流れることができる一定パターンの材料により定められ、そしてその裏材シート上に印刷された少なくとも1の液ガイディング経路：

を含んで成る液輸送デバイス。

2. 請求項1に記載のデバイスであって、そのパターンが、その裏材シート上の液適用ゾーンから延びる少なくとも2の液ガイディング経路を提供し、液が、使用の間にその少なくとも2の液ガイディング経路の各々の内を通り、その少なくとも2の液経路が、合併ゾーンを形成し、それら2つの経路に沿って通った液が併合され；そしてその液ガイディング経路が、その液適用ゾーンからその合併ゾーンまで液又は溶質が流れるのにかかる移動時間がその経路に依存して異なるようなものである。

ことを特徴とするデバイス。

3. 請求項2に記載のデバイスであって、液により担持される溶質についてのRF値において相違する液又は領域についての異なる流速を作り出す化学的又は物理的組成において相違する領域をもつ少なくとも2の異なる液ガイディング経路をさらに含み、その少なくとも2の異なる液ガイディング経路を通る液又は溶質についての移動時間が異なる、ことを特徴とするデバイス。

4. 請求項3に記載のデバイスであって、少なくとも1の液ガイディング経路が、それに沿う溶質の流れを遅らせるためのニトロセルロースを含む少なくとも1の部分をもつようなデバイス。

5. 請求項3に記載のデバイスであって、少なくとも1の液ガイディング経路が、それに沿う速い流れを容易にするための繊維状セルロースを含む少なくとも1の部分をもつようなデバイス。

6. 請求項3に記載のデバイスであって、異なる経路が、長さにおいて相違するもの。

7. 請求項6に記載のデバイスであって、その液ガイディング経路の少なくともいくつか、成分が吸着されるところの部位又は成分又はサンプルの適用に合

った部位を構成する中間部分をもち、それらの経路に沿った液の流れが、それらの部位から成分又はサンプルを輸送する、ことを特徴とするデバイス。

8. 請求項7に記載のデバイスであって、その裏材シートが、プラスチック材料又はガラスのシートを含んで成るもの。

9. 請求項8に記載のデバイスであって、そのプラスチック材料が、液ガイディング経路のパターンの結合を高めるコート層を含むもの。

10. 請求項9に記載のデバイスであって、そのコート層が、エマルジョン・ペイントを含んで成るもの。

11. 請求項10に記載のデバイスであって、そのコート層が、炭素充填樹脂を含んで成るもの。

12. 請求項2に記載のデバイスであって、その少なくとも2の液ガイディング経路が、検出ゾーンと液で連絡されており；そしてそのデバイスが、その裏材シート上に印刷され、そして化学種の検出を可能にするようにその検出ゾーンとの関係で配置された電極アセンブリーをさらに含むことを特徴とするデバイス。

13. 請求項12に記載のデバイスであって、その電極アセンブリーが、作用電極と参照電極を提供するもの。

14. 請求項13に記載のデバイスであって、その参照電極がAg/AgClインクを含んで成るもの。

15. 請求項12に記載のデバイスであって、その検出ゾーンに固定された少なくとも1の試薬を含み、その少なくとも1の試薬が、1

以上の液ガイディング経路に沿って検出ゾーンに運搬された1以上の成分と相互作用するように改作されており、その相互作用がその電極アセンブリーにより計測される、ことを特徴とするデバイス。

16. 請求項15に記載のデバイスであって、その少なくとも1の固定化試薬が、天然又は合成ペプチド・レセプター分子又は結合活性をもつその断片であるもの。

17. 請求項15に記載のデバイスであって、その少なくとも1の固定化試薬が、抗体又は結合活性をもつその断片であるもの。

18. 請求項16に記載のデバイスであって、その検出ゾーンに固定化されたその試薬が、1本鎖核酸であるもの。

19. 請求項18に記載のデバイスであって、その検出ゾーンに固定化されたその試薬が、特異的結合性対のメンバーであるもの。

20. 請求項12に記載のデバイスであって、少なくとも1の経路が、その検出ゾーンから離れて置かれたリザーバー・ゾーンをもち、そのリザーバー・ゾーンが、その液ガイディング経路を通る液流によりその検出ゾーンに輸送されるように改作された成分を含むことを特徴とするデバイス。

21. 請求項20に記載のデバイスであって、より相補的な核酸サンプルにより置換され、そしてその検出ゾーンに輸送されるように、部分的に相補的である核酸の標識ストランドがそれに結合されるところの固定化核酸ストランドを担持する、ことを特徴とするデバイス。

22. 請求項21に記載のデバイスであって、そのリザーバー・ゾーンが、アナライトの第1部分と結合するように改作された第1結合性部分と第2シグナル部分をもつ輸送可能な成分を含み；そしてその検出ゾーンが、そのアナライトの第2部分に結合し、かつ、アナライトの第1部分によりその輸送可能な成分のその第1結合性部分

に結合することを防止されないように改作された固定化試薬を含む、ことを特徴とするデバイス。

23. 請求項22に記載のデバイスであって、そのアナライトが、核酸配列を含んで成り、そしてその第1部分及び第2部分が、その配列の別個の部分であり；その第1結合性部分及び固定化試薬が、それぞれ、その第1と第2アナライト部分に相補的な核酸配列を含む、ことを特徴とするデバイス。

24. 請求項23に記載のデバイスであって、その輸送可能な成分が、酵素ーストレプトアビジン抱合体であり；そしてその検出ゾーンが、ビオチン化アナライトに結合するための固定化成分を含む、ことを特徴とするデバイス。

25. 請求項22に記載のデバイスであって、そのデバイスに適用されたアナライトが検出可能な現象を生じるところの検出ゾーンが存在し、そしてその検出ゾー

ンが、その検出可能な現象の原因である種を保持し、又はその損失を減少させる傾向をもたせるための手段をもつことを特徴とするデバイス。

26. 請求項25に記載のデバイスであって、その検出ゾーンが経路の幅の一部のみに延び、そして横方向の拡散に対するバリアにより片側又は両側において境界を定められる、ようなデバイス。

27. 請求項26に記載のデバイスであって、その検出領域内に提供されるトラッピング・ゾーンをもつもの。

28. 請求項27に記載のデバイスであって、そのトラッピング・ゾーンが、電荷をもつ層又はサイズ排除特性をもつ材料により、提供されるようなデバイス。

29. 液輸送デバイスの製造方法であって；裏材シートを提供し、そしてその裏材シート上に、少なくとも1の液ガイディング経路を提供する材料を印刷することを、含む方法。

30. 請求項29に記載の方法であって、その印刷が、有機溶媒中の材料のスラリーを適用することを含むような方法。

31. 請求項30に記載の方法であって、その材料がシリカ、セルロース、シリカ誘導体又はセルロース誘導体を含むような方法。

32. 請求項31に記載の方法であって、その印刷技術が、スクリーン印刷であるような方法。

33. 請求項14～29のいずれかに記載のデバイスの製造のために適用されるような請求項32に記載の方法。

34. 請求項33のいずれかに記載の方法であって、少なくとも1の経路の中間部分に試薬物質を適用するさらなる段階を含むような方法。

35. 請求項34に記載の方法であって、そのさらなる段階が印刷技術を使用するような方法。

36. 請求項29に記載の方法であって、少なくとも1の経路部分が、液経路を提供するための材料と試薬物質の混合物を、印刷技術により適用することにより製造されるような方法。

37. 請求項36に記載の方法であって、少なくとも1の液経路を提供するための

材料の適用前又は後のいずれかにおいて、電極アセンブリーが、印刷技術によりその裏材シートに適用され；その少なくとも1の液経路が、その電極アセンブリーの少なくとも一部の上に横たわり又は下に横たわる検出ゾーンをもつような方法。

38. 請求項38に記載の方法であって、その電極アセンブリーが、スクリーン印刷により適用されるような方法。

39. 請求項29に記載の方法であって、その印刷が、水性溶媒中の材料のスラリーを適用することを含むような方法。

40. テスト・カード上に液ガイディング経路を印刷するための印刷組成物であって：

それぞれ、フェニル・シリカ・ペースト対ヒドロキシエチルセルロース水溶液の0.2：1～9：1（w/v）の比におけるヒドロキシエチルセルロース水溶液と混合されたフェニル・シリカ・ペースト、を含んで成る組成物。

41. 請求項40に記載の印刷組成物であって、そのヒドロキシエチルセルロース水溶液が、水及びバインダー中ヒドロキシエチルセルロースの1%～25%（w/v）溶液であるような組成物。

42. 請求項41に記載の印刷組成物であって、そのヒドロキシエチルセルロース水溶液が、水中ヒドロキシエチルセルロースの5%～15%（w/v）溶液であるような組成物。

43. 請求項41に記載の印刷組成物であって、そのフェニル・シリカ・ペースト対ヒドロキシエチルセルロース水溶液の比が、0.5：1～2：1（v/v）比であるような組成物。

44. 請求項43に記載の印刷組成物であって、そのヒドロキシエチルセルロース水溶液が、水中ヒドロキシエチルセルロースの10%（w/v）溶液であるような組成物。

45. 請求項44に記載の印刷組成物であって、そのフェニル・シリカ・ペースト対ヒドロキシエチルセルロース水溶液の比が、1：1（w/v）比であるような組成物。

46. 請求項40に記載の印刷組成物であって、そのフェニル・シリカ・ペーストが、リン酸塩緩衝液生理食塩水により水和され、そしてウシ血清アルブミン又はヤギ血清をさらに含むような組成物。

47. 請求項40に記載の印刷組成物であって、そのフェニル・シリカ・ペーストが捕獲抗体をさらに含むような組成物。

48. 請求項47に記載の印刷組成物であって、その抱合体が、抗体／グルコース・オキシダーゼ、ペプチド／グルコース・オキシダーゼ、抗体／アルカリ性ホスファターゼ、ペプチド／アルカリ性ホス

ファターゼ、抗体／ラクテート・オキシダーゼ、ペプチド／ラクテート・オキシダーゼ、抗体／グルタメート・オキシダーゼ、抗体／グルタミナーゼ・グルタミン・オキシダーゼ、ペプチド／グルタミナーゼ・グルタミン・オキシダーゼ、抗体／アルコール・オキシダーゼ、及びペプチド／アルコール・オキシダーゼから成る群から選ばれるような組成物。

49. 請求項41に記載の印刷組成物であって、そのバインダーが、リン酸カルシウムであるような組成物。

50. 請求項41に記載の印刷組成物であって、そのペーストが30～60 (w/v) %フェニル・シリカであるような組成物。

51. 請求項48に記載の、テスト・カード上の液ガイディング経路のための印刷組成物であって、その印刷組成物が、25℃において1～27ポイズであるような組成物。

52. テスト・カード上に液ガイディング経路を印刷するための印刷組成物であって：

100～175℃の間の沸点をもつ第1有機溶媒と45～65℃の間の沸点をもつ第2有機溶媒をさらに含む有機混合物であって、その第1有機溶媒とその第2有機溶媒が少なくとも0.25：1比において混合されているものの中で、3%～10% (w/v) の濃度における酢酸セルロースを含む、
ことを特徴とする組成物。

53. 請求項52に記載の印刷組成物であって、その酢酸セルロースが、少なくと

も40%のアセチル含量をもつような組成物。

54. 請求項53に記載の印刷組成物であって、その酢酸セルロースが、3.5～8 % (w/v) の濃度においてその有機混合物中に溶解されているような組成物。

55. 請求項54に記載の印刷組成物であって、その酢酸セルロースが、4～5 % (w/v) の濃度においてその有機混合物中に溶解されているような組成物。

56. 請求項54に記載の印刷組成物であって、その第1有機溶媒が、シクロヘキサノンであり、そして第2有機溶媒が、アセトンであるような組成物。

57. 請求項56に記載の印刷組成物であって、そのシクロヘキサノン対そのアセトン比が、それぞれ、0.5 : 1～2 : 1であるような組成物。

58. 請求項57に記載の印刷組成物であって、そのシクロヘキサノン対そのアセトン比が、それぞれ、1 : 1であるような組成物。

59. 請求項58に記載の印刷組成物であって、その酢酸セルロース濃度が、その有機混合物中4 % (w/v) であるような組成物。

60. 請求項58に記載の印刷組成物であって、そのペーストが、水中30～60 % (w/v) のフェニル・シリカであるような組成物。

61. 請求項60に記載の印刷組成物であって、その印刷組成物が、25℃において1～27ボイズをもつような組成物。

62. 検出ゾーンをもつ印刷された液ガイディング経路であって：

印刷に好適な裏材シート、

印刷された電極アセンブリー又は光学アセンブリー、及び

検出の間その印刷された検出ゾーンを通る方向性のある液輸送を提供するための印刷された液ガイディング経路、
を含んで成る経路。

63. 請求項62に記載の印刷された検出ゾーンであって、その裏材シートが、エマルジョン・ペイントによりコートされているゾーン。

64. 請求項62に記載の印刷された検出ゾーンであって、その裏材シートが、炭素ベース・パッドをもつようなゾーン。

65. 請求項62に記載の印刷された検出ゾーンであって、その電極アセンブリーを含み、そしてその液ガイディング経路が、芳香環をもつシリカをさらに含む、ことを特徴とするゾーン。

66. 請求項65に記載の印刷された検出ゾーンであって、その液ガイディング経路が、さらにフェニル・シリカを含むようなゾーン。

67. 請求項66に記載の印刷された検出ゾーンであって、その液ガイディング経路が、固定化タンパク質をさらに含むようなゾーン。

68. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、その固定化タンパク質が、以下の検定、HIV、肝炎、淋病、梅毒、サルモネラ、カンピロバクター及びヘルペスの中の1のためのアナライトを捕獲するようなゾーン。

69. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、その固定化タンパク質が、以下の検定、hCG、ウレアーゼ、コレステロール、ビリルビン、グルコース又はラクテート・デヒドロゲナーゼの中の1のためのアナライトを捕獲するようなゾーン。

70. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、流水加速体をさらに含むようなゾーン。

71. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、その流水加速体が、その電極アセンブリーの上流に配置されているようなゾーン。

72. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、排除膜をさらに含むようなゾーン。

73. 請求項71に記載の印刷された検出ゾーンであって、その流水加速体が、乾燥したタンパク質抱合体を含むカバー・シートであるようなゾーン。

74. 請求項67に記載の印刷された検出ゾーンであって、その抱合体が、抗体／グルコース・オキシダーゼ、及びペプチド／グルコー

ス・オキシダーゼから成る群から選ばれるようなゾーン。

75. 請求項74に記載の印刷された検出ゾーンであって、その電極アセンブリーが、触媒炭素電極をもつ2つの電極系であるようなゾーン。

【発明の詳細な説明】

印刷された液輸送デバイス

導 入

技術分野

本発明は、印刷された液輸送デバイス、組成及びそれらの製造方法、並びに検定プラットフォームとしての使用に関する。本発明は、特に、例えば、生物学的サンプルのための分析用センサー・デバイス、例えば、電気化学的検定デバイスに関する。

ある範囲の生物化学的検定を実施するための迅速、簡単な方法の開発は、特に、ヘルス・ケア、環境監視及び食品産業のような領域における、診断分野を、かなり強化するであろう。有効な“現場（on-site）”使用のために、上記デバイスは、最小量の手動操作をもって操作されなければならない、そしてスペシャリストでないオペレーターによる使用に好適でなければならない。現在、実施されている検定のほとんどは、時間がかかり、骨の折れるいくつかの段階を含み、そして技術的レーニングを必要とする。検定成分（例えば、反応体、基質、等）の逐次的添加は、このような検定の固有の特徴であり、技能を、そして多くの場合、一定程度の手の器用さを要求する。

単一のテスト・デバイスを使用する所定サンプル中の多数のアナライトを検出し、そしてモニターする能力は、このような診断テストの使用における改善を容易にするであろう。

以上概説した問題を改善するために、デバイスであって、サンプルへの試薬添加の経時シーケンスをデリバリーするために液流チャンネルを使用するもつが、先に記載されている。GB-B-2 231 1

50は、全てが細孔性材料、例えば、濾紙の単一シートから形成された、共通チャンネルにつながる2つの流チャンネルを含むデバイスの使用について記載している。このチャンネルの中の1は、それが、その共通チャンネルに相対的な遅れを伴ってその液をデリバリーするようにかなりの長さを有する。これは、キャピラリー液流を通じての、共通部位への試薬の逐次経時デリバリーを許容する。チャ

ンネルの複雑なシステムを提供することは容易ではない。長い遅れが必要な場合、チャンネルは、ひじょうに長く、そしてこれ故、ひじょうに回旋されて作られなければならない。これは、不便であり、そして長い遅れをもつ2以上のチャンネルの提供は、実施できない傾向をもつ。R. Bunce et al., Anal. Chim. Acta, 249, 263-269(1991)は、非印刷領域が経路を提供するように、経路が、ワックス-レジストろう染め技術(wax-resist batik technique)を使用して紙の中に疎水性領域を印刷することにより濾紙の1シート上に限定を定められたようなデバイスについて開示している。このような方法は、検定キットの製造において限定された実施用途をもつ。

US 5,194,133は、基質を含むサンプル液の分析のために使用されることができ、るデバイスについて記載している。単一チャンネルが、好適な材料のマイクロマシニングにより形成される。その後、このチャンネルは、クロマトグラフィー分離媒体として作用することができる材料で満たされる。生物学的材料は、このクロマトグラフィー・マトリックス内に取り込まれることができ、制御された反応が生じることを許容する。検出は、そのチャンネルに沿って所定の点に置かれた電気化学的センサーによる。

W. Schramm et al., 'Biosensors'92 Proceedings' (Elsevier Advanced Technology, Oxford, Englandにより発行されたもの) は、固定化された抗体、及びその上流に、試薬の貯蔵(アナライト-

酵素抱合体)をもつ検出ゾーンをもつクロマトグラフィー材料のストリップをもつ免疫検定デバイスについて開示している。磁器チップは、その検出ゾーンに接して置かれた印刷された電極をもつ。使用時、アナライト溶液は、そのストリップに上昇し、そしてその検出ゾーンにその試薬を担持する。アナライトとアナライト-酵素抱合体は、競争して、その抗体に結合する。酵素基質が提供され、そしてその検出ゾーンにおいて電氣的に活性な生成物が生じる。この電極システムは、その強さが、そのアナライト溶液中のアナライトの量に反比例して変化するシグナルを提供する。

本発明の要約

本発明は、裏材シート並びにそれを通して液が流れることができる一定パターンの材料により定められ、そしてその裏材上に印刷された少なくとも1の液経路を含んで成る液輸送デバイスを提供する。このような経路は、その裏材シートの平面に平行な又は垂直な液流をガイドするガイド経路といわれることができる。望ましくは、この（これらの）経路は、検出ゾーンと液で連絡され、そしてそのデバイスは、さらに、化学種の検出を可能にするためにその検出ゾーンと関係をもって配置された電極手段を提供する電極アセンブリーを含む。好ましくは、この電極アセンブリーは、印刷技術により適用される。

上記ガイダンス経路の材料は、典型的には、キャピラリーをもつであろうし、そして吸収性材料及び／又はクロマトグラフィー媒体で作られるであろう。

本発明は、さらに、裏材シートを提供し、そして少なくとも1の液経路を提供する裏材シート上に材料を印刷することを含む液輸送デバイスの製造方法をも提供する。好ましくは、本法は、裏材シ-

トを提供し、そしていずれかの順番において、（i）それに、印刷技術により電極アセンブリーを適用し；そして（ii）その検出ゾーンがその電極アセンブリーの少なくとも一部の上に横たわり又は下に横たわるように置かれた少なくとも1の液経路を提供する材料を、印刷技術によりそれに適用する、ことを含む。

図面の簡単な説明

本発明のいくつかの態様を、添付図面を参照して、実施例により、以下、さらに詳述する。

図1は、第1態様である検定デバイスの平面図である。

図2は、図1中のII-IIの断面であり；図3は、図1中のIII-IIIの断面である。

図4～6は、第2、第3と第4態様の平面図である。

図7は、第5態様の平面図であり；図8は、図7中のVIII-VIIIの断面である。

。

図9と10は、第6と第7態様の平面図である。

図11は、テスト・カードの平面図である。

図12は、図11中に示す検出ゾーンの部分の3次元断面図である。

図13は、アナライトの非存在中でのテスト・カードを使用して計測した対照電流である。

図14は、アナライトの存在中でのテスト・カードを使用して計測した電流である。

特定の態様の説明

本発明は、印刷された液輸送デバイスを提供する。このようなデバイスは、液流が検出され、又は経時されなければならない応用を見い出される。印刷された液輸送デバイスは、アナライトの便利、

かつ、迅速な計測を許容するための検定プラットフォームとして、並びに使い捨てテスト・カードの経済的かつ効率的な大量生産のために、使用されることができる。“テスト・カード”とは、特に小さく、かつ、便利な検定キットにおいて、液中のアナライトの分析のために使用されることができる印刷された液流デバイスをいう。本明細書中に開示された印刷デバイス及び技術は、電気化学的検出手段、例えば、これに限定されないが、本明細書中に討議する印刷電極アセンブリを使用するテスト・カードの製造において特に有用である。

本液輸送デバイスは、裏材シート及びそれを通して液が流れることができる材料の一定パターンにより定められた少なくとも1の液ガイディング経路を含む。本発明の各種態様の図面中に示すように、この液ガイディング経路は、サンプル適用部位から少なくとも検出ゾーンまで液が輸送されることを許容する。典型的には、図面、例えば、図1～10中に開示する各態様中に示すように、印刷液ガイディング経路を通る液の輸送は、裏材シートの平面に垂直な最小の液輸送を伴って、その裏材の平面に平行であろう。通常、（液ガイディング経路中のバッファ―又はサンプル流により提供される）裏材シートの平面に垂直な液輸送は、その裏材シートの平面に平行な液輸送の10%未満であろう。裏材シートの平面に垂直な液輸送は、その液ガイディング経路のいくつかの領域、例えば、その試薬、液適用及び検出ゾーンに関して多量のウィッキング材料を含む廃液ゾーン内のより厚い層領域内で、その裏材シートの平面に平行な液輸送に対して増加するであらう。

う。

一般に、印刷された液ガイディング経路は、印刷された液ガイディング経路を通る方向性をもつ液輸送を提供する。方向性をもつ液輸送は、印刷された液ガイディング経路を形成する材料（単数又は

複数）を通しての、そしてその印刷された液ガイディング経路に沿った少なくとも2点間の、液の正味の輸送(net transport)に関する。例えば、バッファーは、液適用ゾーンに入り、そして液適用の開始位置から遠くの方角にその印刷された液ガイディング経路を形成するマトリックス又は材料を通して輸送される。すなわち、方向性のある輸送である。典型的には、印刷された液ガイディング経路は、アナライトの検出の間に検出ゾーンを通る方向性のある液輸送を提供するであろう。ほとんどの場合において、液輸送は、その液検出ゾーン内で停止されない。本発明のいくつかの態様、例えば、本明細書中に討議するような特定タイプの液加速体をもつものにおいては、液輸送は、その印刷された液ガイディング経路を通る液輸送と平行な、又は一般に同一方向の、キャピラリー流をもつ非マトリックス液輸送領域により支援されるであろう。本発明の多くの態様は、非マトリックス液輸送領域を欠くであろう。このような非マトリックス液輸送領域は、キャピラリー・トラック、チューブ、チャンネル又は、毛細管流を許容するのに適切に離れた2つの平面表面（例えば、ガラス）により形成されたスリットから成るものを含み；このような非マトリックス液輸送領域は、その液の毛細管流を許容する2つの表面間の空気又はガスの隙間により認められる。

本明細書中に開示する印刷技術は、液ガイディング経路のいずれかの所望のパターンを提供する。一般に、液ガイディング経路の所定の印刷パターンとは、方向性のある液輸送を許容するであろう印刷された材料の一定パターンをいう。さらに、異なる“インク (inks)” 又は“ペースト (pastes)” が、異なる流れ特性をもつ液ガイディング経路部分を含むことができる液ガイディング経路作り出すために適用されることができる。一般に、用語“ペースト”は、

典型的には、水又は有機溶媒中、10～60% (w/v) の濃度における材料に関する

る。好ましいペーストは、20～40% (w/v) レンジにおいて使用される。印刷組成物は、通常、25℃において1～25ポイズ、好ましくは、25℃において4～18ポイズ、そしてより好ましくは、25℃において6～12ポイズのレンジにある。用語“流れ特性”とは、液ガイディング経路に沿った液流に影響を及ぼす特性、又はクロマトグラフィーにおけるような担体による溶質の運搬に影響を及ぼす特性をいうことができる。材料は、溶質／溶媒RF値を変えるために使用されることができる。RF値は、特定の溶質により動かされた距離対溶媒前線により動かされた距離の比をいう。例えば、印刷された液ガイディング経路は、異なる速度の液輸送を提供する2以上の異なる材料（“多一材料”）から成る印刷層（単数又は複数）をもって製造されることができる。多一材料液ガイディング経路は、液ガイディング経路における試薬の保持時間を修正し（例えば、抱合体について本明細書中で討議するような保持時間の減少、又は反応が例えば抗体－アナライト相互作用を生じることを許容する保持時間の増加）、非特異的結合を防止し、検定感度を改善し、そしてアナライト検定の再現性を改善することが望ましいときに、使用されることができる。このような多一材料液ガイディング経路は、複数の材料と一緒に混合され、そして次に印刷されるところの不均一印刷層として構築されることができる。多一材料液ガイディング経路は、互いの上に異なる流れ特性をもつ材料の多層を印刷することによっても作られることができる。多一材料液ガイディング経路は、本明細書中にさらに記載する流れ加速体のいくつかのタイプの例である。

印刷された液ガイディング経路は、それらを作るために使用される“インク”中に試薬物質を含ませることにより又はその後の印刷

段階により、試薬物質を含む領域を、提供されることができる。使用される好ましい印刷技術は、スクリーン印刷である。このような領域は、通常、試薬ゾーンといわれる。非一固定化試薬は、好ましくは、迅速な試薬の水和及びより低い試薬保持を許容するために、その液流に素早く試薬を放出する材料上に印刷される。不活性材料は、この目的のために特に好適である。

スクリーン印刷技術は、好ましくは、液ガイディング経路、伝導ストリップ、

電極及びそれらの関連伝導トラックを印刷するために、そして特定の液ガイディング経路位置において試薬を印刷するためにも使用される。エアークラシモ、液ガイディング経路を印刷するために使用されることができる。インク・ジェット印刷は、一般に、 $20\sim 5\mu$ より大きな粒状材料をデポジットするために好適でないが、試薬を印刷するために使用されることができる。

本発明は、検定デバイスにおいて液の流れ及び試薬デリバリーのその後のタイミングを制御する改良技術を利用する。幾何学的に定められ、そして印刷された液ガイディング経路を、その液流をガイドするために使用することができ、そして個々の試薬の適切な保持を容易にし、そしてその検定成分の逐次的デリバリーを支援し、そして強化するために、本質的に異なるクロマトグラフィー材料（例えば、セルロース、シリカ・ゲル、そのシリカの疎水性を増加させるために修飾されたシリカを含むシリカ、デンプン、アガロース、アルギネート、カラギーナン又はポリアクリル・ポリマー・ゲル及びこのような材料の混合物）から作ることができる。異なる物理的、及び化学的特性を、移動時間に影響を及ぼすために使用することができる。例えば、密に充填された小さな粒子は、同一材料のゆるく充填されたより大きな粒子よりもより長い移動時間を作り出す。規則的形狀の粒子は、タンパク質材料の通過を容易にする密に充填

された規則的構造を作るためにデポジットされることができる。

一般に、印刷された液ガイディング経路、特にスクリーン印刷された液経路は、検出可能なシグナルのために、そして均一性を保証するために十分な液を提供するように十分な厚みのマトリックスの薄層を含む。典型的には、単一の印刷層は、厚さ $5\sim 500\mu$ 、そして好ましくは、厚さ $5\sim 100\mu$ 又は $40\sim 100\mu$ 、そしてより好ましくは、厚さ $40\sim 100\mu$ に変わることができる。液ガイディング経路は、合計層厚が通常 $50\sim 500\mu$ 、そして好ましくは、 $75\sim 300\mu$ である多層又は単一層から作られることができる。

“シリカ”は、特定の検定の要求に適合するように選ばれることができるシリカ誘導体を含む。印刷された液ガイディング経路のための平均シリカ粒子は、通常、 $2\mu\sim 100\mu$ 、そして好ましくは、 $5\mu\sim 25\mu$ 又は $10\mu\sim 50\mu$ のレンジにあ

る。例えば、それに成分が固定化されることができる基を担持する商業的に入手可能なシリカ、例えば、疎水性基、特に、フェニル、ベンジル、2芳香環及び置換されたフェニルをもつシリカ、並びにODS2-Silica (5 μ) 及び Spherisorb S5-Epoxy (両者Phase Separations からのもの) が在る。フェニル・シリカは、一般に、短い炭素連結基、好ましくは、長さ1~4の炭素、そしてより好ましくは、1の炭素を介してシラン基に付着されたフェノール基をいう。フェニル・シリカは、検出ゾーンにつながる又はそれに隣接する液ガイディング経路を印刷するために好ましく、そしてより好ましくは、5 μ の平均粒子サイズをもつフェニル・シリカが使用される。一般に、疎水性基をもつシリカ、例えば、フェニル・シリカの役割は、試薬、例えば、捕獲抗体の固定化マトリックスとして、そしてブロックされるとき最小の非特異的抱合体結合をもつマトリックスとして作用することである。

誘導体化シリカは、典型的には、印刷組成物のためのセルロース誘導体と共に使用される。シリカ・ペーストは、10~60% (w/v)、そして好ましくは、40~60% (w/v) の濃度において溶媒を用いて作られる。しばしば、この溶媒は水である。他の溶媒、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、2-ブトキシエチル・アセテート (99%) 及び1-(2-エトキシエトキシ)エチル・エステルを、個々に又は組合せて使用することができる。疎水性基をもつシリカからのペースト、例えば、フェニル・シリカ・ペーストが好ましい。このシリカ・ペーストと混合されたセルロース誘導体は、好ましくは、ヒドロキシエチルセルロースであり、そして典型的には、2:1~3:1の比において(ペースト対ヒドロキシエチルセルロース溶液のw/w)、好ましくは、5:1~2:1 (w/w)、そして好ましくは、1:1 (w/w) の比において混合される。ヒドロキシエチルセルロース溶液は、典型的には、水性ベースであるが、本分野において知られた他の溶媒も、それらが選定した印刷工程と適合する限り、使用することができる。ヒドロキシエチルセルロース溶液は、典型的には、1~25% (w/v)、好ましくは、5~15%、そしてより好ましくは、9~11%である。リン酸カルシウムは、好ましいバインダーである。但し、硫酸カルシウム

・ゼラチン及び本分野において知られた他のバインダーを使用することもできる。典型的には、バインダー濃度は、5～40% (w/w) であり、好ましい濃度は8～14%、そして最も好ましい濃度は、12.5% (w/w) である。マイクロ波処理を、そのペーストの均質化を強化するために使用することができる。このような誘導体化シリカは、本明細書中に記載し、そして本分野において教示されるようなブロッッキング材料を用いてブロックされることができる。タンパク質例えば、本明細書中に記載し、そして本分野に

において知られた検定のために必要なタンパク質は、誘導体化シリカ、特にフェニル及びエポキシド・シリカ上に固定化されることができる。例えば、捕獲抗体、他の捕獲リガンド又は多くのレセプター対が、固定化されることができる。

“セルロース”は、セルロース誘導体を含む。例えば、ニトロセルロースは、(極性) 溶質を遅らせる傾向がある経路部分を提供するために使用されることができる。一方、繊維性セルロースは、速い流れを与えるために使用されることができる。ニトロセルロース流れ特性におけるバリエーションは、クロマトグラフィの分野においてよく知られている。酢酸セルロースは、本明細書中に討議するように、排除膜のために特に有用である。酢酸セルロースは、通常、20～90%の、そして好ましくは、30～50%のアセチル含量をもつ。

印刷技術、例えば、スクリーン印刷を使用して、よく定められ、複雑で、かつ、再現性のある経路パターンを、不活性な裏材材料上に横たえることができる。細孔性材料は、所望の流速のための所望の経路厚さを達成するために、一連の印刷段階により、層内にデポジットされることができる。より厚い経路部分は、より低い流速を示す傾向がある。異なる液ガイディング経路及び／又は液ガイディング経路の異なる部分は、例えば、併合ゾーンにおける溶質の所望のタイミングに依存して、厚さにおいて相異することができる。

スクリーン印刷のために、スクリーンは、印刷されている粒子組成物のサイズ及び粘度に関して選ばれるものと同じである。低粘度は、一般に、層の均質印刷のためにインチ当たりより高いカウントを必要とする。ペーストについては、より大きなメッシュ・サイズ (すなわち、低カウント/インチ) のスクリーンが、通

常、よりよいものである。一般に、スクリーンの孔サイズは、印刷される平均粒

子サイズよりも2～3倍大きい。スクリーンは、しばしば、その印刷組成物中に使用される溶媒からそれらを保護するためにエマルジョンによりコートされる。

裏材シートは、薄いプラスチック材料、例えば、PVC(塩化ポリビニル)シートを含むことができる。裏材シートは、液ガイダンス経路材料の接着を強化するために、より極性の又は親水性のコーティングを提供されることができる。炭素を充填された樹脂組成物(例えば、Electrodag 423 SS グラファイトベース・ポリマー厚フィルム・インク、Acheson Colloid Co., Plymouth, GB)が、電気化学的検出に頼らず裏材シートをコートするために使用されることができる。慣用のエマルジョン・ペイント例えば、Dulux 又は本分野において知られた他のエマルジョン・ペイントは、一般に、電気化学的非電気化学的デバイスの両方にとって好適であることができる。エマルジョン・ペイントは、水中の(一般に合成的な)樹脂のエマルジョン又は分散体から作られた水性(water-thinnable)ペイントである。この樹脂は、塩化ポリビニル、アクリル樹脂、その他であることができる。他の裏材シート、例えば、ガラス又は他のセラミック材料のものは、コーティングを必要としなくてもよい。裏材シート材料は、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリカーボネート/ポリエステル・ブレンド及びポリアルキレンを単独又は組合せにおいて含む。酸化チタンは、性能特性を改善するために上記材料とブレンドされることができる、米国特許第 5,238,737号、この方法を引用により本明細書中に取り込む。

電極のために、さまざまな電極アセンブリーであって、2-及び3-電極ベースのアセンブリーを含むものを使用することができる。2-電極アセンブリーは、それら電極及び伝導トラックの操作及び印刷の容易性のために、好ましい。作
用電極は、好ましくは、触

媒炭素ベース、例えば、MCA4 (MCA, Cambridge, United Kingdom) のようなロジウム炭素(rhodiumized carbon)電極である。炭素と遷移金属、好ましくは白金の組合せに基づく他の電極が、酵素産物の低電位酸化を容易にするために使用され

ることができる。このような電極は、他のタイプの電極、例えば、純粋な炭素又は純粋な白金族ベースの電極により要求されるより高い電圧(600~700mV 対Ag/AgCl参照電極)において、検定産物を計測することに関連する背景ノイズを減少させることを助ける。一般に、電圧スタットのために必要な電流を制限しないように十分なサイズの補助/参照を2-電極系において取り込むことが有利である。参照電極のためには、Ag/AgClは、典型的には、10~90% Ag のレンジにおいて使用される。但し、使い捨てテスト・カードのためには、10%が好ましい。電極は、好ましくは、例えば、液体輸送に対し広い側に電極を置き、そして、参照と作用電極の間にかみ合った(interdigitating)パターンを創出することにより、検出を最大化するように、印刷される。

層又はフィルムの形態における伝導ポリマーは、印刷された電極アセンブリーと共に使用されることができる。通常、この伝導ポリマーは、複素芳香族の伝導ポリマー、例えば、ポリピロール、ポリ(チエニレン・ビニレン)、ポリ(フーレン・ビニレン)、ポリフラン又はポリチオフェンである。メディアター化合物、例えば、これに限定されないが、フェロセン、フェロセン誘導体、非フェロセン・メディアター(例えば、炭素-炭素化合物(カルボランを含む))、ビオロゲン(Viologens)(4, 4'-ビピリジルのN, N'-ジアルキル又はジアリール誘導体)、1次元伝導体(TCNQの塩を含む)、フェナジン染料(フェナジン・メトスルフェート及びフェナジン・エトスルフェートを含む)及び金属ポルフィリン(シト

クローム-Cを含む)及び遷移金属錯体、特に、そのメディアターが少なくとも1又は2の有機環を含むものも、印刷電極アセンブリーと共に使用されることができる。

伝導トラックのために、Agが、典型的には、印刷組成物中で使用される。これらのトラックのサイズは、増加表面領域により創出されるノイズを減少させるために最小化される。典型的には、このようなトラックは、絶縁材料により包まれ、これは、しばしば、コートされ、又は、多くの場合、印刷される。絶縁材料は、通常、マット・ビニル・エマルジョン・ペイントである。他の絶縁及び伝導ト

ラック材料は、それらが、特にスクリーン印刷のために記載された印刷組成物中の使用のために改作される限り、使用されそして本分野において知られることができる。

伝導ストリップは、反応生成物の電極モニタリングの引き金を引くために、本明細書中に記載されたテスト・カードと共に使用されることができる。典型的には、伝導ストリップは、テスト・カードの長さに沿って印刷され、そしてグラフィトーベース・インクから作られる。

本明細書中に開示する製造方法は、デバイスの大量生産に適用可能である。汎用のテスト・カード・デザインが許容される。なぜなら、汎用パターンを用いた印刷スクリーンは、その試薬、そしておそらくその電極を単に変更するが、その液ガイディング経路のパターンを変更することなく、無数の異なる検定のために使用されることができるからである。このテスト・カード・デザインは、その製造工程の適切な部分の代わりに別のスクリーンを単に置き替えることにより、適宜、変えられることもできる。印刷技術は、試薬、例えば：生物学的材料（単数又は複数）（例えば、抗体、標識された抗体、抗原、標識された抗原、抗体断片、細胞レセプター、無傷の

細胞又は核酸）、電気化学的活性化合物（単数又は複数）、例えば、メディアター、例えば、フェロセン、テトラチアフルバレン及びMeldola ブルー）及び必要な非標識又は標識基質（単数又は複数）、例えば、グルコースの液ガイディング経路上の（精密な位置における）デポジションに普遍的に適用可能である。

検出ゾーンは、肉眼、蛍光計測、比色計測、反射、濃度並びに吸収及び透過に基づくような方法を含むさまざまな光学的検出方法に適合するように作られることができる。本明細書中に討議し、そして本分野において知られた検定技術は、生物、細胞、タンパク質及び小分子、例えば、治療薬、物質乱用の薬、ステロイド、及び天然ホルモンを含む、本明細書中に討議するものを含む多くのタイプのアナライトを光学的に計測するために、印刷された液ガイディング経路の使用と併合されることができる。多くの光学的方法、例えば、肉眼ベースの検定のために、印刷された液ガイディング経路は、容易な検出のために反応生成物を位置決

めするために検出ゾーン内で使用されることができる。例えば、捕獲検定の捕獲部分は、予想される反応生成物、例えば、着色生成物の検出を許容するように検出ゾーン内で固定化されることができる。化学種の蛍光スペクトルの吸収（又は特定の波長における増幅）に基づく検定のために、その検出ゾーンは、光が、裏材シート及び輸送される液を通して透過され又は焦点を合されることを許容する裏材シート内に透明の窓を提供されることができる。このような窓は、場合により、印刷された液経路のために使用される材料を欠く。印刷された液経路のための材料がこの窓領域上に印刷される場合、このような材料は、透明でなければならない。あるいは、液ガイディング経路は、各トラックの間に窓をもつ一連のトラックを形成するように印刷されることができ、そしてそれらトラックは、それらトラック間のキャピラリ

ー接触及びそれら窓を横切る液の動きを許容するように適切に距離を保たれる。これらトラックからの光散乱は、化学種により生成された光学シグナルのモニタリングに先立って背景ノイズとして引かれることができる。この又はこれらの窓を通過するシグナルのスペクトル分析は、化学種に関連する光学的シグナルを同定するために特に有用であろう。

本明細書中に記載する光学的アセンブリーは、本明細書中に記載され、そして本分野において知られた検定と併合されることができる。光学検定は、好ましくは、以下の検定成分1) 色変化成分、例えば、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ（ペルオキシダーゼ）（例えば、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジジン (TMB)、2, 2''-アジノビス (e-エチル・ベンゾチオリン-6-スルホン酸) ジアンモニウム塩 (ABTS)、オルト-フェニレンジアミン (OPD)、4-クロロ-1-ナフトール (4-CN)、3, 3'-ジアミノベンジジン・テトラヒドロクロリド (DAB)、又は3-アミノ-9-エチル・カルバゾール (AEC) を使用するもの) ; アルカリ性ホスファターゼ（例えば、パラ-ニトロフェニル・ホスフェート、2ナトリウム塩 (PNP)、ニトロ・ブルー・テトラゾリウム・クロライド (NBT)、5-ブロモ-4-クロロ-3'-インドールイルホスフェート・パラートルイジン (BCIP)、インドニトロテトラゾリウム・バイオレット、NADP、ジアホラ

ーゼ・レッド（フォルマザンformazan）、フェノールフタレイン・モノホスフェート・レッド、又はファースト・レッド、ナフトールAS-MXホスフェートを使用するもの）； β -ガラクトシダーゼ（例えば、オルト-ニトロフェニル-B-D-ガラクトピラノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールイル・ガラクトピラノシドを使用するもの）；グルコース・オキシダーゼ（例えば、グルコース、ペルオキシダーゼ、オルト-ジアニジ

ン・ヒドロクロリド(HRPにより変換されて、生成された H_2O_2)、及びキネイミンを使用するもの）；グルコース・ペルオキシダーゼ、3, 3, 5, 5-テトラメチル・ベンジジン (TMPC HRPにより変換されて生成された H_2O_2)；ウレアーゼ（例えば、ウレア、ヒポクロリット及びフェノール (Bertholt反応はアンモニアを生成する) (インドフェノール) を使用するもの）；クレアチン・キナーゼ（例えば、クレアチニン及びATP を使用するもの）；コレステロール・オキシダーゼ（例えば、コレステロール-4-エン-3-オンのコレステロール色変化形成を使用するもの）；ラクテート・モノオキシゲナーゼ（例えば、ラクテートを使用するもの）；ラクテート・デヒドロゲナーゼ（例えば、ラクテート及びNADを使用するもの）；ウリカーゼ（例えば、尿酸を使用するもの）；マレート・デヒドロゲナーゼ（マレート、オキサロ酢酸、補酵素としてNAD を使用するもの）に結合された抗体又はアナライト結合性部分；2）発光成分ルシフェラーゼ（例えば、ルシフェリン及びATP を使用するもの）；ペルオキシダーゼ（例えば、ルミノール (サイクリック・ジアシル・ヒドラジドを使用するもの)；アルカリ性ホスファターゼ；コレステロール・オキシダーゼ；グルコース・オキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、及びインターターゼ(intertase)の個々又はそれらの好適な組合せのいずれかと共に使用される。 H_2O_2 を生成する光学成分も、本明細書中に討議される電気的アセンブリーのために使用されることができる。

ヘルス・ケア分野に関連する検定は、本明細書中に記載する方法、組成物及びデバイスを使用して行われることができる。このような検定は；1）病原体、例えばHIV、A型、B型及びC型肝炎ウイルス、結核菌 (tuberculosis)、クラミジア、淋病、brachematis、アルツハイマー病のためのタンパク質マーカー、淋

菌 (Neisseri

a gonorrhoea)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、梅毒 (syphilis) (梅毒トレポネーマ(Treponema pallidum))、ヘルペス・ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、結核菌 (ヒト型結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、及びA群連鎖球菌(group A strep) ; 2) 病原体の表面抗原 ; 3) 病原体の抗体 (すなわち、血清学的検定) ; 4) 治療薬、例えば、セオフィリン(theophylline)、ジゴキシン(digoxin)、カフェイン(cafeine)、セオフィリン (theophylline)、アミカシン (amikacin)、ゲンタマイシン (gentamicin)、ネチルミシン (netilmicin)、トブラマイシン (tobramycin)、バンコマイシン (vancomycin)、カルバマゼピン(carbamazepine)、フェノバルビタール(phenobarbital)、フェニトイン(phenytoin)、プリミドン(primidone)、バルプロン酸(valproic acid)、ジゴキシン(digoxin)、ジソピラミド (disopyramide)、リドカイン(lidocaine)、N-アセチルプロカインアミド(N-acetyl procainamide)、プロカインアミド (procainamide)、キニジン(quinidine)、アミトリプチリン(amitriptyline)、ノルトリプチリン(nortriptyline)、イミプラミン (imipramine)、デシプラミン(desipramine)、シクロスポリン (cyclosporine)、アセトアミノフェン(acetaminophen)、クロラムフェニコール(chloramphenicol)、及びメトトレキサート (methotrexate) ; 5) 乱用物質、例えば、バルビチュレート (barbiturates)、ベンゾジアゼピン(benzodiazepines)、カンナビノイド (cannabinoids)、コカイン代謝物 (cocaine metabolics)、メタクアロン (methaqualone)、オピエート(opiates)、メタドン(methadone)、フェンシクリジン (phencyclidine)、アンフェタミン(amphetamine)及びメタンフェタミン (methamphetamine) ; 6) 薬物をモニタリングする治療薬、例えば、セオフィリン、リドカイン、ジソピラミン、N-アセチルプロカインアミド、プ

ロカインアミド、キニジン、フレカイニド (flecainide)、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルミシン(neitilmicin)、ストレプトマイシン、トブラマイシン (tobramycin)、バンコマイシン、カルハマゼピン(carbamaze

pine)、フェニトイン(phenytoin)、フェノバルビタール、プリミドン、バルプロン酸、エトスキシミド(ethosuximide)、メトトレキサート、ジゴキシン、ディジトキシン(digitoxin)、及びシクロスポリン;並びに7)他のアナライト、例えば、hCG、LH、 β -インヒビン(β -inhibin)、チロキシン(thyroxine)及びビリルビン(bilirubin)、についての検定を含む。

食品、獣医及び環境分野に関する検定は、本明細書中に記載する方法、組成物及びデバイスを使用して行われることができる。このような検定は:1)殺虫剤及び化合物、例えば、ジオキシン(dioxins)、ジベンゾフラン、PCB類、トリアジン、アルドリン(aldrin)、アラクロール(alachlor)、アトラジン(atrazine)、パチルス・チューリングンシス毒素、BAY SIR 8514、S-ビオアレチン、クロロスルフロン(chlorosulfuron)、シアンジン(cyanazine)、2,4-D、DDT、ジクロロフォップ-メチル(dichlorofop-methyl)、ジェルドリン(dieldrin)、ジフベンズロン(difubenzuron)、エンドスルホン(endosulfon)、イプロジオン(iprodione)、ケポン(kepone)、マレート・ヒドラジド(malete hydrazide)、メタラキシル(metalaxyl)、オクスフェンダゾール(oxfendazole)、パラスロン(parathion)、パラオクソン(paraoxon)、パラカット(paraquat)、ペンタクロロフェノール、2,4,5-T、ターハトリン(terhutryn)、トリアジメフォン(triadimefon)、及びワーファリン(warfarin);2)家畜疾患、例えば、トキソプラズマ症(*Toxoplasma gondii*)、ウシ流産菌(*Brucella abortus*)、ステ

ファヌラス・デントタス(*Stephanurus dentatus*)、ウシ結核菌(*Mycoplasma bovis*)、ウシ鼻気管炎(*Bovine rhinotracheitis*)、マエディ・ビスナ(Maedi visna)ウイルス、ブタ熱ウイルス、レプトスピラ・イテロガン(*Leptospira interrogans*)、及びコロナウイルス;3)同化作用剤、例えば、 17β -エストラジオール、エストロゲン、テストステロン、 17α -メチルテストステロン、プロゲステロン、trenbolone)、ジエチルスチルベストロール(diethylstilbestrol)、ヘキソエストロール(hexoestrol)、及びゼロマット(zeromat);4)毒素及び病原体、例えば、クロストリジウム・ボツリナム(*Clostridium b*

otulinum)神経毒A, B, E, F, G、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、エンテロトキシンA, B, C, D, E、アフラトキシンB1, B2, B4ジオール、M1, Q1、オクラトキシン(Ochratoxin)、T-2トキシン、3'-OH-T-2トキシン、T-2テトラニルテトラアセテート(T-2 tetranitetracetate)、HT-2トキシン、A群トリコテセン(group A trichothecenes)、ロリジンA(roridin A)、ジアセトキシシルペノール(diacetoxy scirpenol)、デオキシニルバロネル(deoxynivalonol)、3-アセチル・デオキシニルバロノール(3-Acetyl deoxynivalenol)、デオキシベルカロール(deoxyverrucarol)、ゼアラレノン(zearalenone)、ステリグマトシスチン(sterigmatocystin)、ルブラトキシンB(rubratoxin B)、PRトキシン、サルモネラ(*Salmonella*)、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、ビブリオ種(*Vibrio* spp.)、エルジニア(*Yersinia enterocolitica*)、及びカンピロバクター・ジェジュン(*Campylobacter jejuni*)についての検定を含む。

防衛分野に関する検定は、本明細書中に記載の方法、組成物及び

デバイスを使用して行われることができる。このような検定は、炭疽菌の孢子(Athrax spores)(バチルス・アンスラシス(*Bacillus anthracis*))、エボラ(Ebola)ウイルス、スタフィロコッカス・アウレウス・エンテロフィキシンB(&その他)(enterofixin B(& others))、黄熱(Yellow fever)ウイルス、クローン化タンパク質毒素(例えば、ヘビ、サソリ)、ラッサ熱(Lassa fever)ウイルス、及びリシン(Ricin)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)を含む。

コレステロールは、好ましくは、H₂O₂感知電極、好ましくは、パラジウム又は金属キレート化合物、例えば、これに限定されないが、コバルト・フタロシアニンを使用するコレステロール・オキシダーゼ/H₂O₂検定系を使用して計測される。Gilmarin et al., Analyst, 119: 2331-2336 (1994)、これらの方法を引用により本明細書中に取り込む；及びDong et al., Ana. Chim. Acta, 279: 235-240 (1993)、これらの方法を引用により本明細書中に取り込む。このような電極方法は、本明細書中に記載する他の検定と組み合されることもできる。

一般に、本発明を具現化するデバイスは、適用されたアナライトが、直接又は

間接的に、検出可能な現象、例えば、色の生成、色の生成の抑制又は電気化学的に検出されることができる種の生成（又は生成の抑制）に関するもの、を作り出す検出ゾーンをもつ。しばしば、この検出ゾーンは、2以上の液ガイディング経路が1の液ガイディング経路を形成するように合併する、合併ゾーンの下流に置かれる。この検出ゾーンは、上記検出可能な現象の原因となる種を保持し、又はその損失を減少させる傾向をもたせるための手段をもつ。従って、検出ゾーンが、経路の幅の一部だけの上に広がる場合、横方向の拡散へのバリアにより1又は両側において境界を定められることができる。

捕獲ゾーンも、上記検出ゾーンの領域内に提供されることができる。これは、その検出ゾーンにおいて反対の電荷をもつ種を濃縮する目的に役立つであろう電荷層であることができるであろう。例えば、ナフィオン（Nafion）は、好適な負電荷をもつ膜材料である。あるいは、サイズ排除に基づき選ばれる材料、例えば、酢酸セルロースが使用されることができるであろう。

例えば、過酸化水素の生成及びその電気化学的検出に基づくデバイスは、過酸化水素を保持するように改作された検出電極の領域内に捕獲層をもつことができるであろう。

還元されたメディアター（例えば、ヘキサシアノフェレート）の生成に基づくデバイスは、荷電引力によりそのメディアターを保持する捕獲層をもつことができる。

排除膜は、その電極表面のよごれに対して保護することができ、そして同じくポリウレタンから作られることができる。

この電極部位からの非結合抗体抱合体の不完全除去は、その電荷アセンブリーの性能に影響を及ぼすことができる。電極の炭素表面又は電極アセンブリーの図面のマトリックスにくっつく非結合抗体抱合体は、誤りのシグナルを導くことができる。これは、マトリックス、例えば、シリカ、特に、フェニル・シリカの“毛細管力(micking power)”が非結合抱合体を除去するために不十分である場合に、生じることができる。裸の炭素ベースの電極の表面上へのタンパク質抱合体の直接的デポジションを含む実験、その後の（洗浄ボトルを用いた）水での十分

な洗浄は、タンパク質抱合体とその電極表面との間の結合を現した。

非結合抱合体に因る電極系の性能における減少は、1) その(それらの)電極上及び周囲の有効な結合性部位をカバーするためのブロッキング材料の使用、及び2) 反応生成物、例えば、酵素生成物

、例えば、 H_2O_2 が、その電極への非結合抱合体の結合を防止しながらその電極表面まで通過することを可能にする電極を覆うサイズ選択的膜の使用、により克服されることができる。

物質BSA をブロッキングするために、カゼイン、ヤギ血清及びスキム・ミルク、並びに本分野において知られた他のブロッキング材料が、これらの材料が電極計測を妨害しない限り、使用されることができる。好ましくは、テストされるサンプル又はその検定において使用される抗体のいずれか又はそれらの組合せに類似する源を真似又はそれから誘導されるブロッキング材料が使用される。妨害は、その電極アセンブリーに候補ブロッキング材料の可変量を適用し、そして連続する洗浄の後その電極アセンブリーをモニタリングすることにより容易にテストされる。ブロッキング材料がその電気シグナルを減少させない場合、それらの濃度は、ゼロまで低下されることができ、そして保護的な又は排除の膜が、次に、非特異的結合の影響を減少させるために使用されることができる。典型的には、上記電極構造は、その1次補獲抗体が、その電極の炭素表面上に直接的に層を形成するシリカ上に固定化される前に、印刷される。固定化の後に、シリカ、例えば、フェニル・シリカが、通常、1%~10%の濃度レンジ(w/v)内にある、ブロッキング材料の1又は数個のいずれかによりブロックされる。

サイズ選択的排除膜のために、さまざまな材料、例えば、酢酸セルロース、細孔性ポリプロピレン、細孔性ナイロン、細孔性ポリカーボネート、細孔性ポリウレタン、珪素含有エラストマー及び類似の細孔性材料の、単独又は組合せのいずれかにおけるものを、使用することができる。酢酸セルロースは、排除膜のために好ましい。ほとんどの材料、例えば、セルロース材料、特に、酢酸セルロースを用いて印刷された排除膜の得られた細孔サイズは、その溶媒の揮

発性に依存する。低揮発性溶媒は、一般に、小さな細孔サイズを導く。シクロヘキサノンは、酢酸セルロースのための溶媒として特に好適である。比較的低揮発性の溶媒、例えば、シクロヘキサノンの遅い蒸発、そしてその結果として製造される、ひじょうに小さな悪く定められた細孔サイズをもつ膜を回避するために、より高い揮発性の溶媒、例えば、アセトンが、膜の所望の細孔サイズを達成するために上記の低揮発性溶媒と混合されることができる。高揮発性溶媒と低揮発性溶媒の混合は、高揮発性溶媒単独の使用と比較して溶液の“印刷性 (printability)”をも改善する。一般に、3%~10% (w/v) の酢酸セルロース濃度が、シクロヘキサノンとアセトンの変換混合物、例えば、それぞれ、9:1, 2:1, 1:1と 0.5:1 (v/v) をもって使用されることができる。シクロヘキサノン対アセトン比 (v/v) は、好ましくは、0.5:1~2:1、そしてより好ましくは、1:1である。酢酸セルロース濃度は、好ましくは、3.5~8% (w/v)、そしてより好ましくは、4~5%である。特に、低揮発性の溶媒が 100~175℃の沸点をもち、そして高揮発性の溶媒が45~65℃の沸点をもち、そしてその低揮発性溶媒と高揮発性溶媒がそれぞれ少なくとも0.25:1比で混合されるとき、他の有機溶媒が使用されることもできる。好ましくは、高揮発性溶媒と低揮発性溶媒の混合物中4% (w/v) 酢酸セルロースが使用され、そして好ましくは、アセトンとシクロヘキサノンの1:1 (v/v) 混合物が、排除膜を形成するために使用される。この酢酸セルロースのアセチル含量は、好ましくは、少なくとも40%である。このような溶液は、スクリーン印刷に好適であり、その電極領域上に再現性のある排除膜を与える。この技術は、それらの電極から、他の検定試薬又はサンプル構成成分、例えば、細胞断片又は高分子量のタンパク質を排除するためにも適用されることができる。

る。

ガイダンス経路マトリックス内での不所望の試薬の保持は、流水加速体を使用して減少されることができる。流水加速体は、一般に、2つのタイプ: 1) ガイダンス経路マトリックス (単数又は複数) 内、特に所望の試薬の領域内で液流を増加させるために印刷されたガイダンス経路印刷溶液に添加される物質、又は2

）印刷されたガイダンス経路のマトリックス（単数又は複数）とキャピラリー接触する所望の試薬の非マトリックス・デポジットを有する。このような流水加速体は、そのガイダンス経路内での試薬、例えば、抱合体の保持が、アナライトの存在中、そのシグナルの検出を妨害するために十分に大きなシグナルを生成するとき、そのガイダンス経路への特に有用に添加される。例えば、マトリックス、特に、フェニル・シリカ・マトリックスを通しての又は周囲の抱合体のより速い流水は、アナライトの存在又は非存在中、電気的計測の性能を高めることができる。すなわち、より低いバックグラウンドが作られ、そのシグナル対ノイズ比は、高められることができ、そしてその検定の再現性は、改善されることができる。いくつかのマトリックス、例えば、シリカ、特に、フェニル・シリカの場合において、そのマトリックス上への試薬の乾燥デポジティングは、その移動性のバッファー又はサンプル液前線により、試薬、例えば、抱合体の不完全な水和を導くことができ、抱合体のかなりの割合が保持され、そしてリザーバー又は試薬ゾーンからゆっくりと放出されることを導く。

印刷されたガイダンス経路の水和マトリックスへの試薬の流れ及び放出を改善するために、試薬、例えば、抱合体が、その印刷されたガイダンス経路とキャピラリー接触するカバー・シートの表面上に、非印刷技術を用いて別々に印刷され又はデポジットされる。典

型的には、キャピラリー接触は、そのガイダンス経路へのじかの適用においてカバー・シートの設置から生じるであろう。カバー・シートは、マトリックス、例えば、所望の試薬の素早く除去できるリザーバーとして作用する合成スポンジを用いてコートされ又は印刷されることができる。試薬は、そのマトリックスと混合され、又は、そのマトリックス上又はそのカバー・シート材料の表面上で直接に乾燥されることができる。本明細書中で討議するカバー・シート態様の全てについて、そのガイダンス経路を通して、その適用部位からその検出ゾーンまでの流れを最適化するように、そのカバー・シートを配置することが好ましい。試薬の水和を改善する材料は、材料、例えば、これに限定されないが、ゼラチン、絹フィブロイン、キトサン、コラーゲン及びポリアクリルアミド、又はそれらの組

合せを、そして好ましくは、ゼラチン、キトサン又は絹フィブロイン、又はそれらの組合せを含む。印刷されたガイディング経路材料は、特に、多マトリックス材料が使用されるとき、マトリックスの水和性を改善するために少なくとも1の界面活性剤と混合されることもできる。このような界面活性剤は、5～7炭素原子のアルカンスルホネート、トウィーン20 (Tween 20)、(好ましくは)ヘキサン・スルホネート、スルフィノール (Surfynol) (30モルの酸化エチレンによりエトキシ化されたテトラメチルデシンジオール)、トリトン (Triton) (オクチル・フェノキシ・ポリエトキシ・エタノール)、シルウェット (Silwet) (ポリアルキレンオキシド修飾ジメチルシロキサン) 及び短鎖アルカンスルホネート、例えば、メタンスルホネート又はプロパンスルホネート又は長鎖アルカンスルホネート、例えば、8～10炭素原子を含むものを含む。

上記印刷されたガイダンス経路とのキャピラリー接触は、マトリックスを欠くストリップ又は島 (islands) 上に試薬を置くことによ

っても確立されることができる。試薬は、ストリップ又は島として、裏材シート、特に、PVC 又はコートされたPVC 裏材シート上に直接に適用されることができる。このような島又はストリップは、好ましくは、印刷された液ガイディング経路内に置かれる。あるいは、キャピラリー伝導孔は、試薬を提供するために、その孔の内側に場合により置かれた不活性ウッキング材料 (例えば、スポンジ) と共に、その裏材ストリップ内にデザインされることができる。このようなストリップ、孔又は島は、その試薬の水和を許容するためにその周囲又は隣接ガイダンス経路を通しての液の流れにより引き金を引かれる素早く放出される試薬リザーバーとして作用する。好ましくは、このような試薬島は、三角形に形状化され、最も小さな度の角度が、液流に最初に接するその三角形の点を形成する。ガイダンス経路をカバーし又はその上に置かれることと無関係に使用されるとき、用語カバー・シートは、本明細書中に討議するようなストリップ及び島を含む。カバー・シートは、所望の試薬を横切る液流を保証するために適用されることができる。

印刷されたガイダンス経路の水和マトリックスへの試薬の流れ又は放出を改善

するために、試薬、例えば、抱合体及びガイダンス経路であって、速い輸送マトリックスと遅い輸送マトリックスの混合物であるものが、提供される。速い輸送マトリックスは、その電気シグナル対ノイズ比を減少させるゆっくりと動く試薬の流れを加速するために印刷されたガイダンス経路を作るためのガイダンス経路インクに添加されることができる。

図1～3中に示す第1態様は、液適用ステム又はゾーン(5)に狭くなる、一般に直方形の主要部(3)を提供するように形状化されたPVC裏材シート(1)をもつ。このシート(1)の1の外面は、中程度の粒子のスラリーをスクリーン印刷し、その後、その溶媒

を蒸発させ、細孔性デポジットを残すことにより適用されたクロマトグラフィー媒体(例えば、シリカ又はセルロース)のパターンをもつ。このパターンは、ステム(5)と浸漬領域(13)から延びる単一液ガイディング経路(14)をカバーする、浸漬領域又はゾーン(13)を提供する。その遠端は、液リザーバー又はゾーンを提供するための増加領域を有する。この例においては、それは、2つのリザーバー・アーム(16)をもって分枝している。この経路の幅と長さは、本検定の実施に最大の利点を与えるように選択されるであろう。必要により、この経路は、その厚さを増加させ、そしてこれ故、試薬の保持を増加させるために、上記細孔性材料の追加のスラリーにより重層されることができる。この経路上には、既知容量のサンプルがデポジットされることを予定されるスポッティング点(11)が示されている。また、この経路上には、本検定の他の成分(例えば、試薬又は基質)のデポジションのための乾燥リザーバー部位又はゾーン(12)が示されている。いくつかのこのような部位は、典型的なデバイスにおいて経路毎に含まれ、例えば、スクリーン印刷により適用されることができるであろう。

使用に際して、ステム(5)は、別個の又は統合された容器内に保持されたバッファー溶液中に浸漬される。このバッファーは、毛細管力及びクロマトグラフィー力によりその経路に沿って流れるであろう。その際、本検定の他の成分は、溶かされ、そしてその液流によりその乾燥リザーバーから担持されるであろう。最終的に、その液前面は、その反応がモニターされることができる検出領域に達

するであろう。

このようなデバイスの使用の1例は、酵素結合イムノアッセイ (enzyme-linked immunoassay) のためのものであろう。本検定は、標識された抗原を含む“捕獲イムノアッセイ (capture immunoassay)

”の使用に基づくことができるであろう。酵素標識抗原は、乾燥リザーバー部位 (12) において固定化された好適な抗体と複合体を形成するであろう。この酵素反応に好適な基質は、その検出領域又はゾーン (15) 上にデポジットされるであろう。この酵素反応の生成物は、例えば、色の変化、電気化学的シグナル又は光の放出により、その後、検出される。

上記デバイスの典型的な使用に際しては、既知容量の液体サンプル (例えば、尿) が、スポッティング点 (11) に適用されるであろう。このデバイスのステム端は、次に、上記バッファー溶液中に浸漬されるであろう。液が経路まで上昇してガイドされるとき、そのサンプル溶液は、上記乾燥リザーバー部位を通過するであろう。そのサンプル溶液中に存在する抗体は、固定化された抗体から上記結合標識抗原を変位させるであろう。この解放された標識抗原は、上記バッファー中に担持され、そしてその基質との反応が生じるであろう検出領域まで上記経路によりガイドされるであろう。例えば、この基質の存在中での比色計測基質を使用するとき、不溶性の色が作り出されるであろうし、そしてこの色の強度は、存在する標識された抗原の濃度により測定されるであろう。高濃度の所望のアナライトを含むサンプルは、より高い強度の色を作り出すであろう。廃液リザーバーは、そのキャピラリー流が継続し、そして検定を完結させることを許容するようにその検出領域の後方に置かれる。

図4は、上記アプローチのさらなる展開であり、これにより、2以上の液経路の存在が、多分析が実施させることを許容する。本明細書中に述べられ、そして本分野において知られたアナライト検定は、上記タイプのテスト・カード・デザインと共に使用されることができる。それは、浸漬領域 (13) から延びる4つの液ガイディング (14a, b, c, d) の使用を示している。これは、任意の数で

あり、そして液ガイディング経路のいかなる数又は組合せも、上記デバイスと共に使用されることができるであろう。個々のサンプルからのアリコートであってもなくてもよい既知容量のテスト溶液が、その液ガイディング経路の各々の上の適切な部位においてスポットされる。あるいは、テスト溶液、例えば、サンプルが、多分析のための多液ガイディング経路を導く単一の液適用において適用されることができる。このテスト溶液は、その乾燥試薬リザーバー上をその検出領域までガイドされる。各サンプルは、独立してモニターされる。その適切な経路材料及びその個々の液ガイディング経路の幾何形状を選択することにより、その検定は、各アナライト・モニタリング・システムの要求に合うようにあつらえられることができる。これらの検出領域の先には、共通の又は個々の廃リザーバー系が置かれるであろう。流れは、それぞれのリザーバーが飽和し、そしてそれらの反応が完結したときに、停止する。それ故、このリザーバーの面積、材料、深さ及び組成は、個々の検定のそれぞれの首尾より操作に影響を及ぼすであろう。

図5と6は、本発明のさらなる改良を示す。このアプローチにより、単一の検定が、2以上の液経路を用いて行われる。これは、単一部位（検出領域）への、一定レンジの検定成分の逐次的、経時デリバリーを許容する。各経路は、選択された材料（単数又は複数）及び所定の幾何形状及び厚さ（又は厚み）を用いて構築されることができる。これ故、液流及び個々の検定成分の保持は、有効に制御されることができる。

図5と6は、浸漬領域（13）から延び、そして合併ゾーン（15）でもある検出領域又はゾーンにおいて合流する、3つの液ガイディング経路（24a, b, c / 34a, b, c）をもつデバイスを示す。この先に、リザーバー（16）がある。両方の例において、中央の経

路（24b / 34b）は、サンプルのためのスポッティング点（11）をもち、そしてその外側の液ガイディング経路は、乾燥試薬リザーバー（12a, 12c）をもつ。さらに、これらの液ガイディング経路は、液が、3つの液ガイディング経路の全に沿って浸漬領域（13）からリザーバー（16）まで流れるようなものである。中央経路24b / 34bに沿っての流れは、試薬が1の外側経路からのその領域に到

達する前のいずれかの時において、そのスポッティング点 (11) からその検出領域 (15) までサンプルを運搬し、そして他の外側経路からの試薬がさらに遅れて到達する。図 5 中、この逐次的デリバリーは、この 3 つの液ガイディング経路を長さにおいて相異なるものとするにより達成される。図 6 中、外側の液ガイディング経路は、中央の経路と長さにおいて等しいか又は同様のものであるが、それらは、少なくとも一部、組成において相違する（特に、その乾燥試薬リザーバーの下流の経路部分の全部又は一部は、リザーバー (12a, c) の上流に対する速い流れを許容するはずである。）。従って、これら外側の液ガイディング経路は、その中央経路がセルロースから形成されながら、ニトロセルロースを含む部分を含むことができる。1 の外側の経路は、ニトロセルロースを含むか、そして／又はそのより高比率を含む混合物から形成された、その長さの中のより大きな割合をもつことができる。その材料、その厚さ及び幾何形状を変えることにより、個々の液ガイディング経路のデリバリー特性をよくチューニングすることは、印刷技術を用いて直ちに達成されることができる。

このようなデバイスの使用の例は、“サンドイッチ型”のイムノアッセイである。1 の外側経路 (24a / 34a) は、(12a) に置かれた 1 つ乾燥リザーバーをもつ単一の材料から成る。この中央経路 (24b / 34b) は、戦略上重要な点に置かれたスポッティング点 (

11) をもつ。他の外側の経路 (24c / 34c) は、その長さに沿って置かれた ((12c) に位置する) 1 の乾燥リザーバーをもつ。

既知のサンプル容量が、中央経路 (24b / 34b) 上に (そのサンプルが乾燥印刷経路に結合することを防止するために不活性ウィッキング材料 (例えば、スポンジ) によりライニングされた孔 (hole) 又は本明細書中に記載する孔、島又はストリップであることができる) スポッティング点に適用され、そしてそのバッファー溶液は、例えば、好適なバッファーのトラフ内にそれを置くことにより、そのデバイスの浸漬領域端に導入される。このサンプル溶液は、ガイダンス経路を上方に検出領域まで担持される。このサンプル中に存在する抗原は、その検出領域上に固定化された抗体により“捕獲 (captured)”される。この中央経路に沿

ってのバッファの連続フローは、非結合抱合体及びこの検定を妨害することができる他の物質を除去するであろう。この間に、バッファは、第1の外側経路(24a/34a)に沿って連続的にガイドされるであろう。この流れの結果として、その乾燥リザーバー(12a)の成分(本実施例においては、適切な酵素により標識された第2抗体)が、そのバッファ流に溶解され、そしてその検出領域(15)の方に担持されるであろう。クロマトグラフィー材料の幾何形状及び/又は性質は、その検出領域への試薬の到達のタイミングに影響を及ぼすであろう。標識された抗体(抱合体)は、その検出領域上に既に結合された抗原と結合して複合体を形成するであろう。連続した流れは、過剰の非結合の標識された抗体を除去するであろう。他の外側の経路(24c/34c)内でのバッファの同時の流れは、最終的に、(12c)に位置する乾燥リザーバーに到達するであろうし、そしてその内容物(本実施例においては、好適な比色計測物質)がこの液流中に溶解されるであろう。この経路は、通常、保持時間の点で最も長いであらう。

う。最後に、その基質が、その検出領域における抗体-抗原-抗体複合体に到達し、そして着目のアナライトの存在を示す検出反応を作り出すであろう。

図7と8は、電極アセンブリーを含む単一経路のデバイスを示す。絶縁材料の裏材シート(101)(例えば、PVCフィルム)が、1端の中心から延びるタブ(102)をもつ四角形の形態をもつ。このシートは、電極アセンブリーを、本実施例においては、タブ(102)上のパッド(104)に接触するように伝導ストリップ(105a)に接続された2つの電極(105)をもつ、タブ付き端に隣接する領域内にスクリーン印刷されている。その後、その電極(105)の上に横たわり(そしてこれ故、それとじかに接する)部分を含む、クロマトグラフィー材料(例えば、シリカ又はセルロース)のパターンが印刷された。これらの電極は、反応体の存在中電気化学的反応を行うようにデザインされる。この2つの電極編成は、作用電極と参照電極から成る。本実施例においては、(Ag/AgClインクから成る)参照電極は、反対電極として作用し、電子の源又はシンクのいずれかとして作用するであろう。(類似のデバイスは、例えば、グラファイトから成る第3電極(反対電極)をもつ、3-電極編成をもつ。この場合、その電流は、その作用電極と反対電極を

通るであろう。) グラファイト印刷インクに基づくものであることができる作用電極材料の組成は、要求; 例えば、反応生成物の酸化を高めることに適するように変更されることができ、触媒材料が、そのインク組成物に添加されることができ。一般に、この電極編成は、一連の層、例えば、(その電極外面から接触点までの) 伝導トラック、上に横たわるパッド(電極要求に対して伝導性である) 及び(その溶液からの接触点を隔離するための) 絶縁包みを用いて構築されることができ。

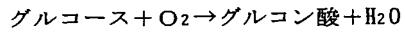
このガイダンス経路は、正確な位置にデポジットされたスポッティング点(112)と乾燥リザーバー(113)をもつ単一トラック(110)から成る。この経路の一端に、そのパターンが、裏材の幅全体をカバーするように広がる。これが、例えば、その溶出バッファーを含むトラフ内にそのデバイスの上記領域を入れることによりその溶出バッファーが導入されるところの浸漬領域(117)である。この経路の他端は、(その電極編成の上に横たわる) 検出領域(116)をカバーし、そしてその後、廃液リザーバー(118)を提供するように広がる。

操作の間、そのデバイスが、“ワンショット(one-shot)”変位イムノアッセイのために使用されることができることが認識される。典型的な例は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)ホルモンの検出である。この検定により、酵素(例えば、グルコース・オキシダーゼ)により標識された抗原が、乾燥リザーバー部位(113)において固定化抗体に付着される。この実施例における酵素反応のための基質、グルコースが、十分な量において、この検出領域にデポジットされる。これらの電極は、選ばれた電位に釣り合った電圧スタットに接触パッド(104)により接続される。サンプル溶液は、スポッティング点(112)上にデポジットされ、そしてバッファー溶液が、そのデバイスの下端に導入される。バッファーは、毛細管作用により、浸漬領域(117)からその経路(110)の上方にガイドされる。その流れは、その点から、それがサンプルに溶解されるところのスポッティング点(112)の上を通過する。標識された抗原を含む乾燥リザーバー(113)にその溶液が到達するとき、変位反応が生じる。解放された標識抗原は、その酵素が、この部位に存在する基質との反応を経験するところの検出領域(116f)までそのバッファ

一流中に担持される。グルコースとグルコース・オキシダーゼとの反応は、

以下のようなものである：

グルコース・オキシダーゼ



この生成物たる過酸化水素は、2－又は3－電極系を用いて電圧計測により検出されることができる。十分に高い電圧において過酸化水素が酸化されるであろうし、そして結果として、電流が発生するであろう。この電流のモニタリングは、まず、そのサンプル溶液中にアナライトの存在を、そして次に、存在するアナライトの量を、示すであろう。サンプル溶液が高濃度の抗原を含む場合、より大きい変位が生じるであろうし、そしてこれ故、より大きな電流が発生するであろう。これとは反対に、そのサンプル溶液中の低濃度の抗原は、より小さな電流を作り出すであろう。あるいは、グルコース・オキシダーゼ検定系は、抱合体、この場合、上記アナライトに結合するグルコース・オキシダーゼ標識抗体が、非固定化試薬であるところの“サンドイッチ検定”において使用されることができる。

図9は、上記アプローチを用いて検定を実施するための別の編成を示す。第1態様の要素に対応する要素は、対応の参照番号をもつ。複数のガイダンス経路(121, 122, 123) (本実施例においては3)が、不活性な裏材(101)上に印刷される。それらは、検出領域(116)において合流する。各々が、スポッティング点(112)又は乾燥リザーバー(113)をもつ。この液ガイディング経路は、リザーバー(113)とスポッティング点(112)からの成分が、異なる時に検出領域(116)に到達するように、長さにおいて相違する。再び、2－又は3－のいずれかの電極系が、その検定のための要求に依存して、このデザインに取り込まれることができる。図10は、等価なデバイスを示す。ここで、液ガイディング経路(131, 132, 133)は、長さ

において大きく相違しないが、その検出領域における逐次的なデリバリーを与えられるように選ばれ、そしてデポジットされた、少なくとも一部、異なる材料から成

る。例えば、ニトロセルロースは、液ガイディング経路又はそれらの部分のためにより遅い輸送時間を与えるように取り込まれることができ；繊維性セルロースは、より速い時間を作り出すために取り込まれることができる。

図9又は図10のデバイスは、数シリーズのガイダンス経路が試薬デリバリー及び洗浄段階を容易にするために使用されることができるとような“サンドイッチ型”のイムノアッセイのために、使用されることができる。

例えば、図9の態様においては、その中央及び最短経路(121)は、サンプル・デポジションのための、スポッティング点(112)をもつ。hCGに特異的な抗体が、検出領域(116)の表面上に固定化される。ガイダンス経路(122)は、より長く、そして酵素（グルコース・オキシダーゼ）により標識された抗体がデポジットされるところの乾燥リザーバー(113)を含む。再び、これらの電極は、その検出期間の間に選択された電位において釣り合された電位スタットに接続される。

スポッティング点へのサンプル溶液の適用後に、そのデバイスの下端が、バッファーのトラフ内に浸漬される。このバッファーは、毛細管作用により液ガイディング経路の上方に移動する。中央経路(121/131)上、サンプルが、その検出領域(116)上の移動バッファーにより一緒に担持される。ここで、そのサンプル中に存在する抗原が、この領域において固定化された抗体により捕獲される。バッファーの連続流は、結合されていないサンプル成分のいずれをも除去するであろう。この期間の間に、バッファーは、2番目に長い経路(122)（又は2番目に遅い経路(132)）に沿ってたどり、そのリザ

ーバー(113)から第2の（酵素標識された）抗体を溶解するであろう。この流れは、サンプル及び標識された抗体が、検出領域に既に固定化された抗原-抗体形成とサンドイッチ複合体を形成するであろう後に、その検出領域に到達するであろう。両ガイダンス経路からの連続バッファー流は、その検出領域から非結合標識抗体を除去するであろう。最終的に、最も長いバッファー流、そしてしばしば、最も遅い経路(123/133)が、検出領域に酵素基質（グルコース）をデリバリーし、そしてその酵素反応が生じるであろう。再び、生成物たる過酸化水素の電流計測酸化により発生する電流が、測定されることができる。この電流の大きさは

、サンプル中のアナライトの濃度、そしてそれ故、検出領域で形成された抗体-抗原-抗体複合体により、測定されるであろう。

イムノアッセイの実施に加えて、上記提案されたデバイスが、相補配列をもつ核酸配列の特異的結合に基づいて、ハイブリダイゼーション検定を実施するために使用されることができる。このデバイスのデザインは、そのハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変更するために異なるバッファーが使用されることを許容する。伝統的なハイブリダイゼーションベースの系は、時間が掛かり、そして数段階を含み、これ故、訓練されたオペレーターを要求する。本デバイスの使用は、より簡単、かつ、より迅速であろう。これは、医療、食品及び環境適用に伴う一定レンジの検定の開発を許容するであろう。

多くの異なる核酸検定形式が構想されることができる。標識、例えば、酵素たるグルコース・オキシダーゼは、この反応生成物が上記イムノアッセイについて記載されるように実施されることができるように、取り込まれることができる。いくつかの検定形式において、それは、ユーザーにより標識されたサンプル核酸であろう。例

えば、標的1本鎖核酸配列が、検出領域上に固定化される。このデバイスの端がサンプル溶液中に浸漬されるとき、上記酵素により標識されたサンプルは、クロマトグラフィーの液ガイディング経路を上方に移動し、そしてそれがその検出領域の上を流れるとき、その相補アナライト配列が捕獲される。2-トラック系（図9又は10の単純化バージョン）を使用して、今やその検出領域上に存在する標識の検出のために、好適な時間遅れの後に、デリバリーされる。あるいは、標識されたサンプルは、スポッティング点に適用されることができるであろうし、そしてバッファーはその後、そのサンプルをその標的に輸送し、そしてその酵素基質がデリバリーされる前に非結合サンプルのいずれをも洗い流すであろう。別の編成においては、サンプルは、電極の上方の標的領域の直接に接して置かれる。この場合、そのアナライト配列の全てが捕獲される前に、サンプルがその領域から遠くに毛細管移動することを防ぐために、サンプル・ウェルの両側の周囲に不透性バリアを取り込むことが必要かもしれない。サンプル・ウェルの使用は、そ

のウェル上に膜を取り込む可能性をも許容する。これは、いくつかのサンプルの前処理、例えば、分析された細胞調製物からの死骸の除去を実施することができるであろう。

この標的付け段階をユーザーにとってより簡単にするために、特異的結合性対合系、例えば、ビオチン／ストレプトアビジン系が使用されることができる。この検定においては、ユーザーは、サンプルのビオチン標識付けを実施するであろう。これは、例えば、PCR技術を使用した、標準的及び簡単な手順である。このサンプルを、次に、速い又は遅いトラック上のスポッティング点に、又はアナライト配列に相補的な固定化標的配列をもつ検出領域に直接的に適用されるであろう。このデバイスは、スポッティング点に適用された

サンプルのいずれをも標的領域にデリバリーし、そして非結合サンプルのいずれをも洗い流すように、第1トラックの上方に速く移動するであろうバッファー中に浸漬されるであろう。2番目に遅いトラックは、標的領域にストレプトアビジン-酵素抱合体をデリバリーするであろう。ストレプトアビジンは、ビオチン標識に結合し、そしてこれ故、標的に相補的な配列のいずれかのサンプルにより電極上にトラップされる。過剰の抱合体は、最長トラックが電気化学的検出のための酵素基質をデリバリーする前に、廃リザーバー内に移動し続ける。

さらなる検定形式であって、ユーザーがいずれの標識付けをも実施しないようなものも可能である。より短いトラック上の乾燥リバー内には、2本鎖核酸配列が存在するであろう。これら鎖の中の1は、固定化されるであろうし、一方、その相補鎖は、移動性であり、そして酵素により標識付けされるであろう。一般に、この標識されたストランドは、部分的にのみ相補的であり、例えば、より短く、そして／又はミスマッチを含むであろう。サンプル配列（アナライト）は、より高く相補性であろう。従って、サンプルがデバイス内を上方に移動するとき、その相補配列は、標識されたストランドを置換するであろう。次に、これは、このトラックを上方に移動し、そしてその検出領域上に固定化された標的配列により再捕獲されるであろうし、これ故、より長いトラックがその基質をデリバリーする前にその電極上に酵素標識をトラップするであろう。

さらなる改良は、“サンドイッチ”型のハイブリダイゼーションの使用である。この2-標的核酸において、配列を使用される。これらは、そのサンプル配列の反対側の端に相補的であり、これ故、3つの配列の全てが存在するとき、そのサンプルは、上記2つの標的の間にリンクを形成する。

標的1は、酵素により標識され、そしてより短いトラック上の乾燥リザーバー内に置かれることができるであろう。標的2は、その検出領域上に固定化されるであろう。このサンプルがデバイス上に移動するとき、それは、まず、標的1にハイブリダイズし、そしてそれ故、標識され、そして次に、それが検出領域の上を流れるときに標的2により捕獲される。あるいは、サンプルと標的1の間のハイブリダイゼーションは、スポッティング点への上記混合物の適用の前に管内で実施されることができるであろう。他の検定に関しては、その酵素基質は、そのバッファー流による非結合サンプルの除去を許容するために好適なインターバルの後にデリバリーされる。2つのハイブリダイゼーション段階を取り込むこのアプローチは、高く特異的な検定の開発を許容するであろう。

このタイプの検定のさらなる開発は、アフィニティー剤としての、例えば、細胞表面からの、天然又は組換えタンパク質ペプチド・レセプターの取り込みである。細胞から精製されたレセプターに加えて、全細胞レセプター又はタンパク質結合性タンパク質の結合性部位を真似る合成ペプチドが使用されることができるであろう。これらは、全レセプターよりも安定性であり、そして操作がより容易であることができる。このレセプターは、検出領域上に固定化されるであろう。あるいは、レセプター又は他のアナライトに結合するペプチドが固定化されることができるであろう。競争又は置換検定形式が使用されることができるであろう。これらの最初においては、酵素標識に抱合したアナライトが乾燥リザーバー内に存在し、そしてこれは、それらが検出エリアの上を流れるとき、サンプル中に存在する非標識アナライトとそのレセプター部位について競合する。従って、より多くのアナライトがそのサンプル中に存在すればする程、より少い標識が、その酵素基質がより長いトラックによりそ

の後にデリバリーされるとき、電極領域上に存在するであろう。置換タイプの検定においては、標識されたアナライトに結合したレセプター又は合成ペプチドは、その電極領域上に固定化されるであろう。サンプル・アナライトは、そのサンプルがその電極上を流れるときその標識されたアナライトを置換するであろう。置換された量は、サンプル中のアナライトの量に比例するであろう。次に残存標識が、より長いトラックが基質をデリバリーするときに、電気化学的に検出される。

第3の可能性においては、レセプターが、移動性の標識要素として使用される。レセプターのためのリガンドは、検出領域上に固定化され、そして標識されたレセプターが、最短／最速のトラック上の乾燥リザーバーに置かれる。サンプルは、このトラックに適用され、そしてそれがそのデバイスの上方に担持されるとき、それは、上記の標識されたレセプターと相互作用する。これが次に検出領域上に流れるとき、そのサンプル中に存在するリガンドに結合していないレセプターが、固定化されたリガンドに結合されるようになる。従って、この検出領域上にトラップされた標識は、サンプル中のリガンド濃度に反比例する。サンプル・リガンドに結合されたレセプターは、廃リザーバー内に流れ続ける。より遅い／長いトラックが、検出領域内にトラップされたレセプターの検出のための標識基質をデリバリーする。

さらなる異形においては、移動性のレセプター又は結合性タンパク質が、検出領域上に固定された抗体により捕獲される。レセプターのためのリガンドは、同一経路上であるが、標識されたレセプターを含有するリザーバーの上流に固定化される。サンプルは、このトラックに適用され、そしてそれがそのデバイスの上方に担持されるとき、それは、その標識されたレセプターと相互作用する。サン

プル中のリガンドと相互作用しなかったレセプターは、その経路に沿って遠くに置かれた固定化リガンドにより捕獲される。サンプルからのリガンドに結合したいずれのレセプターも、その固定化されたリガンド上を通過し、そしてその検出領域において捕獲される。従って、その検出領域上に捕獲された標識は、サンプル中のリガンド濃度に比例する。

他の酵素系が、電気化学的に検出されることができるであろうシグナルを作り出すために使用されることができると認識される。この検定のさらなる改良は、その検出領域からのその除去を特異的に遅らせることにより、その酵素反応からの電気化学的に活性な生成物（例えば、 H_2O_2 又はメディアター、例えば、フェロセン又はヘキサシアノフェレート）を濃縮して、その電極において高められたシグナルを導く目的をもって、電極をカバーするようにトラッピング層を取り込むことであろう。このアプローチは、所定のサンプル溶液中での低濃度のアナライトの検出をかなり改善することができるであろう。

図1, 5, 6, 8, 9及び10中に概説したデザインのいずれも、それらのデザインが、統合分析システムを形成するように掛け合されることができるところの、多-アナライト及び/又は多-サンプル分析の基礎を形成することができるであろう。この分析系は、好適な裏材材料の単一ストリップ上の専用の液ガイディング経路のアレイ及びディテクターとして印刷されることができる。この構築は、液ガイディング経路のクロマトグラフィー材料、厚さ及び幾何、乾燥リザーバー部位及び電極の位置決め、各アナライトの個々についての最適化されたデザインを許容するであろう。さらに、デザインのいずれかの組合せを、最適化された統合分析システムを形成するために使用されることができる。例えば、図8と10中に概説する

デザインは、裏材材料の単一ストリップ上に印刷されることができる。

実施例1：光学的検出のためのスクリーン印刷されたガイダンス経路

検定デバイスを、図5中に示すように、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotrophin (hCG)）のために調製した。各々が、その上に浸漬領域（13）、リザーバー（16）、及びその浸漬領域（13）からリザーバー（16）まで延びる異なる長さの3つの液ガイディング経路（24a, b, c）を定めるために、一定パターンのクロマトグラフィー材料がデポジットされている裏材シートをもつ。これらの液ガイディング経路は、接合領域において合流し又は合併領域（15）は、それらが単一経路によりそれに接続されるところのリザーバーに隣接する。

経路パターンの準備

このクロマトグラフィー材料又はマトリックスは、HPLCのための分離マトリックスとして使用される一定グレードのシリカ（5 μ Spherisorb, Phase Separations, Clwyd, GBから入手可能）であった。それは、バインダー（リン酸カルシウム又は硫酸カルシウム）の乾燥粉末（5重量%）と混合された。この混合物は、2-ブトキシエチル酢酸を用いてスラリーとされた。

裏材シート（P. V. C.）を、形状に切断し、そして上記シリカを印刷する前にマット・エマルジョン・ペイントを用いて片側上にコートされた。それは、1時間40℃において乾燥された。

慣用のスクリーン印刷装置は、その上に所望のパターンが常法により定められたスクリーンを用いて提供された。第1の印刷段階のために、これは、接合領域（15）を除き図5中に示す全パターンであった。調製された裏材シートは、このスクリーン下に置かれた。

このスラリーは、ゴム・スキージー（rubber squeegee）により上記スクリーンに適用された。スラリーは、裏材シートの印刷表面上にパターンを提供するためにスクリーンを通過した。このシートを除去し、そして1時間40℃において乾燥に供した。同一手順を使用する第2印刷段階において、その接合領域を、（同様にPhase Separations から入手可能な）官能化Spherisorbを使用して印刷した。

分析デバイスの調製

さまざまな試薬を、段階（a）からのパターン化されたシートに適用した。本実施例においては、これは、手動で行ったが、大量生産のためには、それはさらなる印刷段階、例えば、スクリーン印刷、インク・ジェット印刷又はエアー・ブラシ印刷により行われることができるであろう。

hCG に特異的な抗体の溶液を、検出領域（15）を形成するために、その接合領域上にデポジットした。この後に、12時間4℃においてインキュベーションを行った。この検出領域を、蒸留水で数回洗浄し、そして45°よりも高くない温度で風乾した。（室温又は37°のいずれかを一般に使用した。）ウシ血清アルブミンを、hCG に特異的な抗体と反応しなかった。活性部位のいずれをもブロックする

ために添加し、そしてこのシートを 1 時間 4℃でインキュベートした。この検出領域を蒸留水で数回洗浄し、そして乾燥に供した。

hCG に対する標識抗体を、中間長の経路 (24c) 上のリザーバー部位 (12c) にデポジットした。標識付けは、グルコース・オキシダーゼに対する抱合を含んでいた。これらの標識抗体を、バッファー溶液中に適用し、これを、結合抗体と同一条件下で乾燥に供した。この結合抗体とリザーバー内の移動性抗体は、共に、hCG に結合するが、それらは、本実施例において異なるエピトープを認識する。

酵素のための色生成基質 (o-ジアニシジンとパーオキシダーゼ) の乾燥デポジットは、最長経路 (24a) 上のリザーバー部位 (12a) で形成された。

スポッティング点 (11) は、その経路の表面上又は裏材シートの隣接部分上で慣用の非水性インクによりマーキングすることにより最短経路 (24b) 上に示された。

使 用

2つのデバイスをテストした。hCG 含有バッファーのテスト・サンプルを、1の“テスト”デバイスのスポッティング点 (11) に適用し、一方、バッファーの対応容量を、他の“対照”デバイスのスポッティング点 (11) に適用した。これらのデバイスを、それらの浸漬領域 (13) が実質的に浸漬されるように、バッファーのタンク内に入れた。液ガイディング経路を上方に向う溶媒前線の通路を監察することができた。10分未満で、全ての液ガイディング経路が横断した。対照デバイスの検出領域 (15) は、o-ジアニシジン(o-dianisidine)の過酸化水素による褐色生成物へのペルオキシダーゼ触媒酸化のために、強い色を顕出していた。テスト・デバイスの検出領域 (15) は、ほとんど着色していなかった。

実施例 2 : アナライトの電気的検出のためのスクリーン印刷ガイダンス経路

図 9 中に示すデバイスを調製した。PVC シートを、形状に切断し、そして (実施例 1 と同様に印刷して裏材シート (101) を提供した。数回のスクリーン印刷段階を、(a) 参照電極を形成するために Ag/AgCl を用いて ; (b) 作用電極、伝導性ストリップ (105a) 及び接触パッド (104) を形成するために グラファイト・

インクを用いて；（c）伝導性ストリップを絶縁するための樹脂インクを用いて；そして（d）電極(105)上に適用される検出領域(116)を含む経

路パターンを形成するために実施例1と同様のシリカ・スラリーを用いて、レジスター内で行った。hCG に特異的な抗体を、検出領域内で固定化した。次にウシ血清アルブミンを、結合抗体分子間を埋め、そしてこれ故非特異的結合を防止するために検出領域上にインクジェット印刷した。GOD-標識抗体を、経路(122)上に乾燥リザーバーとしてデポジットする。グルコースを、最長経路(123)上に乾燥リザーバーとしてデポジットする。スポッティング点(112)を、最短トラック(121)上にマークする。

使用のために、電圧スタットを、1のデバイスの接触パッド(104)に結合させた。hCG を含有するサンプルを、スポッティング点に適用した。浸漬領域(117)を、バッファー中に浸漬させた。電力スタットを通る電流をモニターした。最初の低ベースライン・レベルは、そのバッファーがサンプルを一旦、標識されたGOD及びグルコースを検出領域に運搬すると速やかに上昇した。電流を時間に対してプロットした。適用されたサンプル中の異なる量のHCGを用いた同一デバイスを使用する一連の実験は、そのプロット内のピークの高さが、そのサンプル中のhCGの量と相関したことを示した。

実施例3：hCGの電気的検出のためのスクリーン印刷ガイドンス経路

スクリーン印刷されたテスト・カードを、図11中に示すようなhCGの検出のためのガイドンス経路を用いて調製した。テスト・カードを、ポータブル、ハンドヘルド・リーダー内への挿入に好適な約45mm×30mmのサイズのPVC裏材シート(400 μ)を使用して製造した。

テスト・カードを、DEK Printing Machines Ltd. (モデル247)からのスクリーン・プリンターを使用してスクリーン印刷した。テスト・カードの各領域を、図11中に示すように、印刷のために使用さ

れたスクリーンにより指図された規定パターンを使用して印刷した。スクリーンを、印刷のために使用されたインクの粒子及び溶媒組成に基づき選んだ。電極(2

00)、Ag/AgCl電極(210)、炭素伝導ストリップ(220)、作用電極ベース・パッド(230)、絶縁包み(240)、作用電極(250)、酢酸セルロースの膜(260)へのAg伝導トラックの印刷のために、200 カウント/インチ・メッシュ・サイズのスチール・スクリーンが、 23μ のエマルジョン厚さ及び 45° の配向角度をもって、使用された。シリカ・ゲル液ガイディング経路(270と275)、大きなフェニル・シリカ液ガイディング経路(280)、及び小さなフェニル・シリカ液ガイディング経路(290)の印刷のために、125カウント/インチ・メッシュ・サイズのスチール・スクリーンが、 23μ のエマルジョン厚さ及び 45° の配向角度をもって使用された。

印刷された領域をもつテスト・カードを以下のように作った：

(a) PVC 裏材シート (400μ m厚) を、テスト・カードを形成するためにギロチンを使用してサイジング ($45\text{mm}\times 30\text{mm}$) した。

(b) マット・ビニル・エマルジョン・ペイント(クラウン・ビニル・マット、Crown Decorative Products, Ltd., United Kingdom)を、テスト・カードの全領域上に3回塗布し、そして各コート間に 40°C において30分間乾燥させた。

(c) 2つのAg伝導トラック(200) (1層) (銀インク・electrodag 477SS RF U, Acheson Colloids, Prairie Rock, Plymouth, United Kingdom) を、作用及び参照/カウンター電極のために印刷した。デポジション後に、テスト・カードを、 40°C において30分間放置乾燥した。

(d) Ag/AgCl参照電極(210) (1層) (10%Ag, Materials Characterization & Analysis Services, Melbourne Science Park,

Moat Lane, Cambs, United Kingdom) を、そのガイダンス流路の流れに平行な配向において、ビニル塗布されたPVC テスト・カード上に印刷した。デポジション後、これらのカードを、 40°C において30分間放置乾燥させた。

(e) 作用電極のカーボン・ベース・パッド(230) (グラファイト・インクelectrodag 423SS, Acheson Colloids) 及びカードの全長にわたって走る2つの伝導性ストリップ (グラファイト・インクelectrodag 423SS) を、同一スクリーンを使用して同時印刷した。

(f) 絶縁包み(240) (1層) を、有機溶媒(マット・ビニル・ホワイト、Apollo Colours Ltd, Plumstead, London, United Kingdom)を用いて印刷し、そして40℃において1時間乾燥に供した。絶縁包みのためのものと同じスクリーンを使用して、マット・ビニル・エマルジョン・ペイント (2層) (段階bと同じペイント) を、上記絶縁層上に印刷し、そして40℃において30分間乾燥に供した。

(g) 作用電極(250) (2層) を、3% (蒸留水中w/v) ヒドロキシエチルセルロース溶液5ml中のMCA4 (Materials, Characterization & Analysis Services) により供給される、ロジウム炭素(rhodinized carbon)に基づく触媒炭素粉末) 5mgとして調製した作用電極インクを使用して印刷した。この作用電極を、液ガイディング経路内の液流に垂直に印刷した。この溶液を、回転スターラー上で1時間攪拌して均一溶液を達成した。各適用後、インクを40℃において30分間乾燥に供した。

(h) 作用電極と参照/反対電極の両方の電気的連続性を、それらの電極外面とそれらの対応伝導トラックの間の良好な接触を保証するために、作用電極の印刷後に、テストした。

(i) 主チャンネル(270) (4層) とグルコース・フィーダー経路(275) (4層) を、7gの、バインダーを含まない高純度等級の

シリカゲル (平均粒子サイズ5-25 μ 及び平均細孔直径60Å)、3gのリン酸カルシウム (2塩基性) バインダー及び14gの3% (水中w/v) ヒドロキシエチルセルロース溶液 (周囲温度、20℃) として調製したシリカ・ゲル・ペースト溶液を使用して印刷した。この溶液を、均一なコンシステンシーが達成されるまで金属スパチュラを使用して手で攪拌した。上記4層を各印刷後、カードを、40℃において45分間乾燥させた。

(j) 酢酸セルロース膜(260) (2層) を、アセトンとシクロヘキサノンの1:1 (v/v) 溶液中4% (w/v) の酢酸セルロース粉末 (アセチル含量は約40%であった。) として調製した酢酸セルロース溶液を使用して印刷した。各印刷後、このカードを室温において30分間乾燥させた。

(k) 電極(280) (4層) を取り囲むフェニル・シリカ (Phase Separation Lt

d, Deeside Industrial Park, Clwyd, UK) 領域を、2 : 1 (w/v) 比における水中の10%ヒドロキシエチルセルロース溶液と混合されたフェニル・シリカ・ペーストとして調製されたフェニル・シリカ溶液を使用して印刷した。ヒドロキシエチルセルロースは、そのペーストが印刷されることを許容する有機バインダーとして作用する。このフェニル・シリカ溶液を、均一なコンシステンシーを達成するためにガラス棒を使用して攪拌した。各印刷の後、これらのカードを、室温において45分間乾燥させた。このフェニル・シリカ・ペーストを以下のように調製した：

(1) 5 μ のフェニル・シリカ粒子 (2 g) を、ガラス瓶内で計量し、PBS (リン酸塩緩衝液化生理食塩水) バッファーで2回洗浄し、そして遠心分離機を使用して (5分間、4000 Gにおいて) 回転沈降させた。

(2) 上記フェニル・シリカ粒子を、次に、12~24時間回転ス

ターラー上4℃においてPBSバッファー溶液中5% BSA中でインキュベートした。

(3) 得られたBSA ブロックされたフェニル・シリカを、PBS バッファーで3回洗浄して、非付着BSA を除去し、次に、ヤギ血清とPBSバッファー (1 : 1 比) の溶液中に再懸濁させた。ヤギ血清を、BSA タンパク質により占有されていない非特異的結合性部位の全てをブロックするために、インキュベートした。

(4) ヤギ血清中のフェニル・シリカ・ペーストを、15時間4℃においてインキュベートし、次にPBSバッファー中で3回洗浄し、そして要求されるまで4℃において保存した。

(1) フェニル・シリカ/捕獲抗体領域(290) (2層) を、以下のように調製されたフェニル・シリカ捕獲抗体溶液を使用して印刷した：

(1) フェニル・シリカ粒子 (2 g) (5ミクロン) を、小さなガラス瓶内で計量し、PBS バッファーで2回洗浄し、そして次に、遠心分離機を使用して回転沈降させた (5分間、4000 G)。

(2) これらのシリカ粒子を、次に、5 mlのPBS バッファー中に懸濁させ、そして抗体溶液(1.0ml, 10.1mg/ml、ヤギ・ポリクローナル抗- β hCG) を、そ

のシリカに添加した。完全混合の後、その溶液を、回転スターラー上4℃において12～24時間インキュベートした。

(3) フェニル・シリカ／抗体混合物を、遠心分離を使用して回転沈降させ(5分間、4000G)、そしてPBSバッファー中で3回洗浄して非付着抗体を除去した。

(4) 洗浄後、この混合物を、回転スターラー上、4℃において12～24時間PBS バッファー溶液中5%BSAと共にインキュベートした。

(5) BSA ブロックされたフェニル・シリカを、PBS バッファーで3回洗浄して非付着BSA を除去し、次に4℃において16時間PBS バッファー／ヤギ血清(1:1比)溶液中に再懸濁させた。

(6) この最終的なブロッキング段階の後、BSA／ヤギ血清ブロックされたシリカを、PBS バッファーで3回洗浄し、そして要求されるまで4℃において保存した。

各印刷の後、これらのカードを室温において45分間乾燥に供した。

(m) グルコース溶液(2μlの0.1M溶液)をグルコース・デリバリー経路に沿って中間(halfway 300)に適用し、そして室温において45分間乾燥させた。0.1Mグルコース溶液を、0.1M塩化カリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウムpH6.8中で調製し、そして18時間4℃において保存して変換共に供した。

(n) ブロックされた抗体／抱合体(320)(1.5μl)を、より大きなカバー・シート(30mm×10mm)上に適用し、そして室温において1時間乾燥させた。ブロックされた抗体／抱合体(ヤギ・ポリクローナル抗-α-hCG／グルコース・オキシダーゼであって、水中2%BSAにより1:1に混合されたもの)溶液を、BSA と抗体抱合体を混合することにより調製して、1%の最終ブロッキング・タンパク質濃度を得た。乾燥後、その乾燥した抱合体が作用電極領域の約5～7mm上流にあるように、マス킹・テープの狭いストリップを、主(フェニル・シリカ)経路上のより大きなカバー・シートに固定した。第2のより小さなカバー・シート(2×15mm)は、オプションであり、そして第2のグルコース・デリバリー経路上に置かれることができる。その働きは、適宜、この経路を通る液の流

れを加速することである。

(o) 完成したテスト・カードを、使用するまで 4℃において保

存した。

図12は、図11中の検出ゾーンの 3 次元断面を示し、PVC裏材シート(310)、エマルジョン・ペイント(320)、カーボン・ベース・パッド(330)、触媒カーボン(340)、酢酸セルロース膜(350)、フェニル・シリカー抗体層(360)、PVCカバー・シート(370)、及び抱合体(320)を示す。

段階 a～n は、このようなテスト・カードの製造のための好ましい順序である。これらの段階の順番は、他の検定試薬の特定の要求に合わせられることができる。いくつかの段階だけが、本発明の最も単純化された態様の中のいくつかを製造するために行われることができる。すなわち、検出ゾーンをもつ液ガイディング経路の印刷。

テスト・カードを、抗原を含むか又は含まない (1,000mIUのhCG(最終濃度)) 0.1Mリン酸ナトリウムと0.1M塩化ナトリウムから成るバッファー溶液pH7.0 を使用してテストした。複合培地中での操作へのこのテストの利用可能性を立証するために、テストを、抗原を含むか又は含まない非妊娠女性からの希釈された尿中でも行った。この尿を、0.1塩化カリウムpH6.8 を含む 0.1Mリン酸ナトリウムから成るバッファー溶液で 1 : 1 に希釈した。ポジティブ・コントロールを調製するために、この尿／バッファー溶液を、hCG によりスパイクして、500mIUの最終濃度を得た。テストを、+350mV(Ag/AgCl電極に対する)の適用電圧において行った。アナライトの存在は、捕獲された免疫-酵素-アナライト複合体により生成されたH₂O₂の酸化による、電流における増加により示された。

図13は、ネガティブ・コントロール・テスト・カードの電気化学的応答を示す。抗原(偽陽性)は、全く検出されなかった。なぜなら、その電流が、140秒間を超えて一定に維持されたからである。

抗原は、ネガティブ・コントロール尿サンプル中でも検出されなかった。

図14は、ポジティブ・コントロール・テスト・カードの電気化学的応答を示す

。抗原（真陽性）は、120秒以内に検出された。なぜなら、その電流は、140秒間を超えて線形に増加したからである。抗原は、ポジティブ・コントロール尿サンプル中でも検出された。

実施例4：検出ゾーンのための酢酸セルロース・サイズ排除膜

酢酸セルロース膜を、検出ゾーン内での非特異的結合を減少されることにより検出可能なシグナルの損失を減少させるそれらの能力についてテストした。テスト・カードを、実施例3中に記載したように調製した。但し、本明細書中に言及したテスト・カード調製方法を変更した。膜を、(0.5%~6% w/v)の酢酸セルロースのレンジをもつシクロヘキサノンとアセトンの混合物としてテスト・カード作用電極の上に印刷し、そして本明細書中に検討するグルコース・オキシダーゼ検定システムを使用してテストした。(シクロヘキサノンとアセトン1:1中 w/v)の3%~5%の酢酸セルロースの濃度は、バックグラウンド・ノイズを減少させ、そしてテスト・カード検定の再現性及び精度を改善した。3% (w/v) 未満(0.5%~約3%)の酢酸セルロース濃度は、印刷インクのために好適ではない。なぜなら、その粘度は印刷を許容しなかったからである。フェニル・シリカは、その膜の構造を破壊せずに酢酸セルロース膜上に直接に印刷されることができるであろう。酢酸セルロースの溶液(アセトンとシクロヘキサノンの1:1混合物中4%)から調製された酢酸セルロース膜は、最良のバックグラウンド・シグナル、応答時間及び印刷特性、並びに再現性の改善、及びテスト・カード検定の精度を作り出した。

実施例5：抱合体保持を減少させるための流水加速体

不所望の抱合体保持を減少させるための流水加速体の使用を、PVC カバー・シートに適用された抱合体放出性リザーバーを使用してテストした。2つのタイプの流水加速体を、ガイダンス経路と検出ゾーン内での不所望の抱合体保持を減少させるためにテストした：1) 合成スポンジ、例えば、PVC カバースリップに結合された皿洗い用スポンジから放出された抱合体及び2) PVC カバー・シート上のデポジットから放出された抱合体。

合成スポンジを、糊を使用してPVC カバー・シートに結合させた。いくつかの

タイプのスポンジ材料を、水和の間に乾燥した抱合体を完全に放出するそれらの能力についてテストした。これらのスポンジをメスを用いて均一サイズ（長さ15 mm、幅10mm、及び厚さ3mm）に切断し、そして商業的な糊、例えば、ボスチック（bostik）を使用してPVC カバー・シート（長さ30mm、幅10mm、及び厚さ 400 μ m）に接着した。抗体抱合体(1.5 μ l) 0.6mg/mlを、PVC へのスポンジの接着の完了の間中央位置においてそのスポンジ上の中央にデポジットした。カバー・シートを、電極ゾーンの5～7mm上流に、そして主経路と毛細管接触するように、この場合においては、主フェニル・シリカ経路上じかに、置いた。マスキング・テープがその場にそのカバー・シートを固定した。

あるいは、抱合体を、PVC カバー・シート上で直接乾燥させた。抱合体を、PVC カバー・シート上 1.5 μ lとして中心にデポジットし、そして室温において1時間放置乾燥させた。乾燥後、カバー・シートを、電極検出ゾーンの5～7mm上流に、そして主経路と毛細管接触させて、この場合においては、主フェニル・シリカ経路上じかに、置いた。

抱合体放出性スポンジ・カバー・シート又は抱合体放出性PVC カバー・シートのいずれかをもつテスト・カードを、バッファー溶液

中にテスト・カードを浸漬し、そして本明細書に記載のサンドイッチ・グルコース・オキシダーゼ系を使用してhCG について検定することによりテストした。ネガティブ・コントロール溶液は、抗原を全く含まず；ポジティブ・コントロール溶液は、標準的な（500mIU）のhCG 濃度を含んでいた。完全洗浄後（テスト・カード上のシリカ・ゲルの完全飽和まで）、カバー・シートを除去し、そして2 μ lの0.1Mグルコース溶液を、抱合体放出性スポンジ・カバー・シート又は抱合体放出性PVC カバー・シート・テスト・カードのいずれかにおける電極領域の表面上に直接ピペット供給した。両タイプのカードについてのネガティブ・コントロールは、非結合抱合体が電極部位から除去されていることを示す免疫複合体からの電気化学的応答をはっきりと示さなかった。これに反し、両タイプのカードについてのポジティブ・コントロールは、hCG を含むサンプル溶液からの電気化学的応答をはっきりと示した。

【図 1】

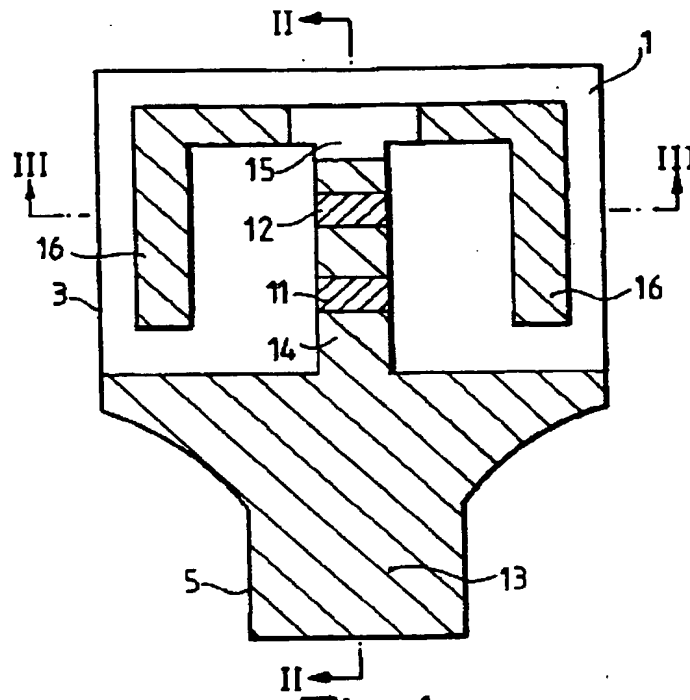


Fig.1.

【図 2】

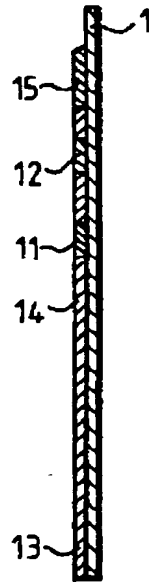


Fig.2.

【図 3】



Fig.3.

【図 4】

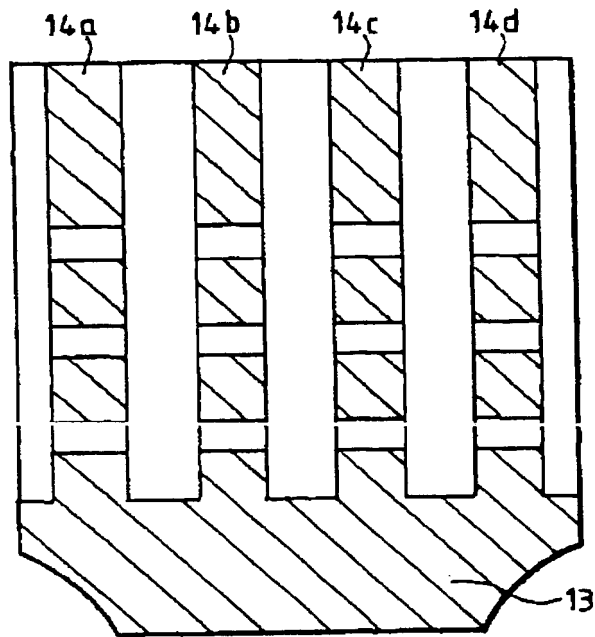


Fig.4.

【図5】

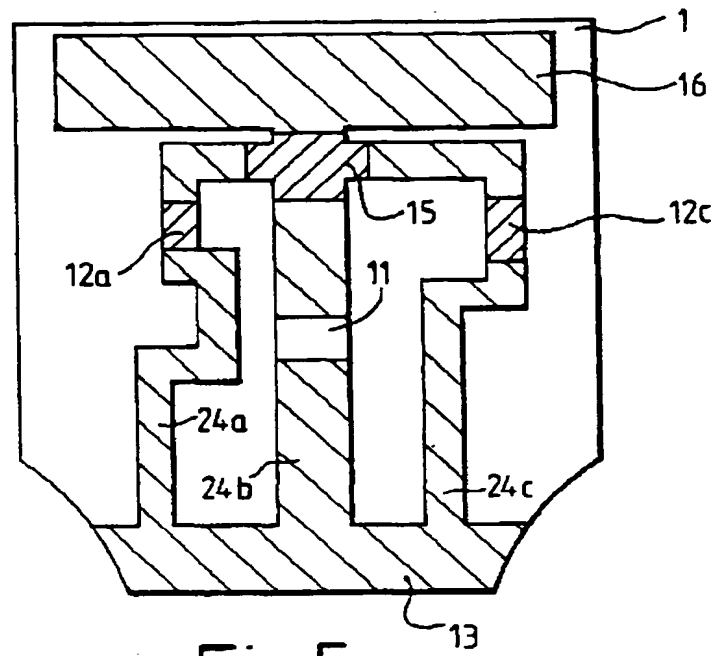


Fig.5.

【図6】

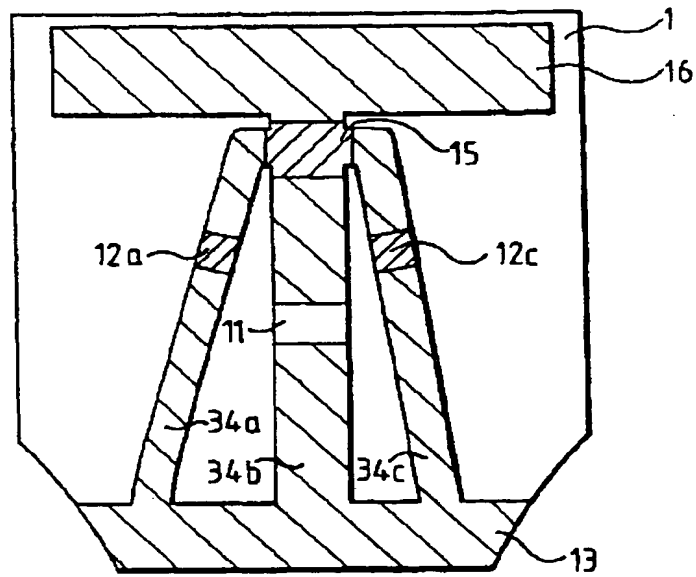


Fig.6.

【図7】

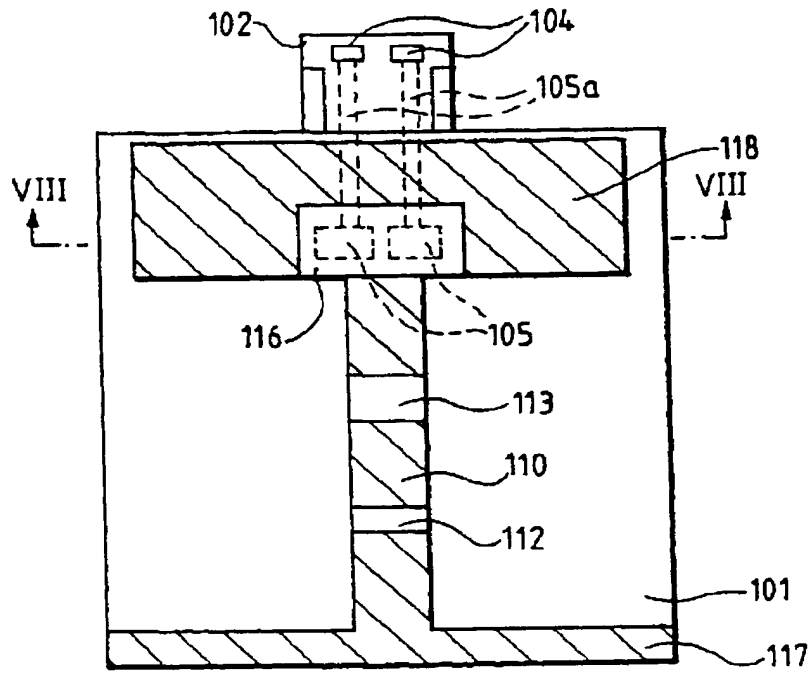


Fig.7.

【図8】

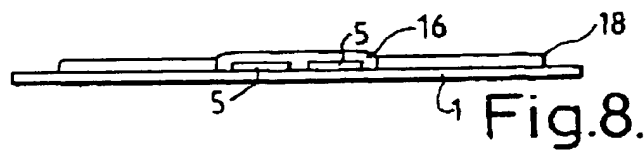
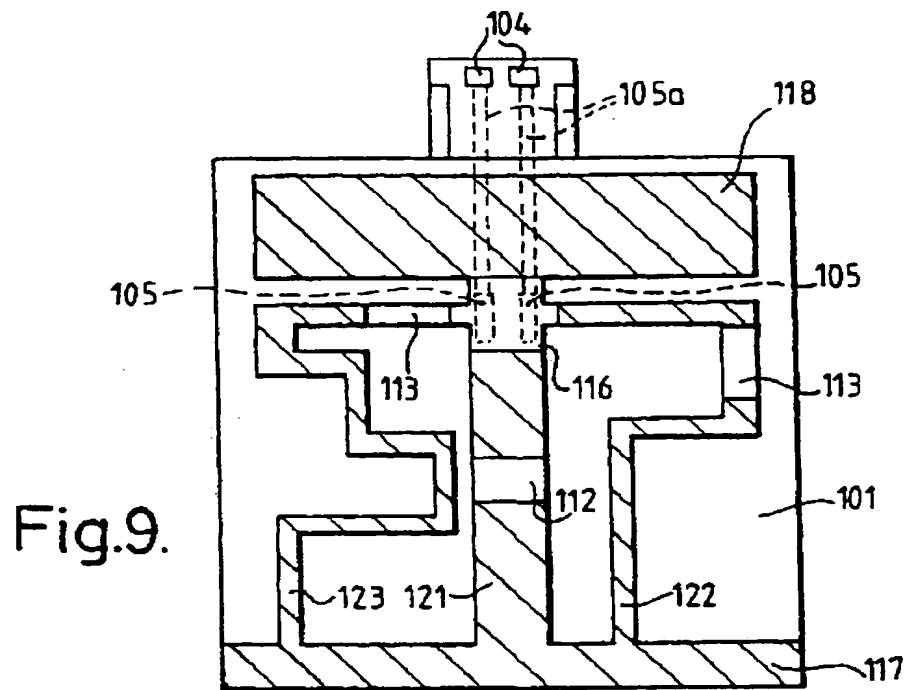
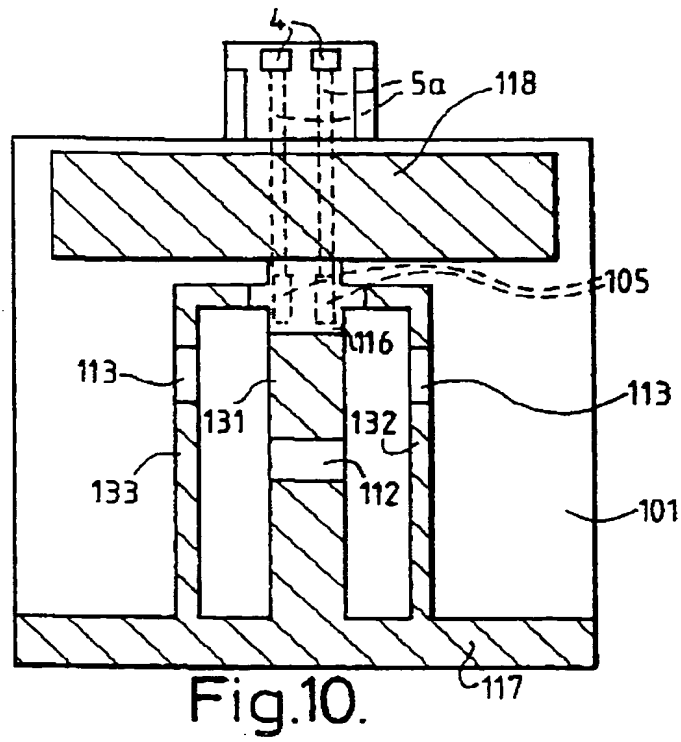


Fig.8.

【図9】

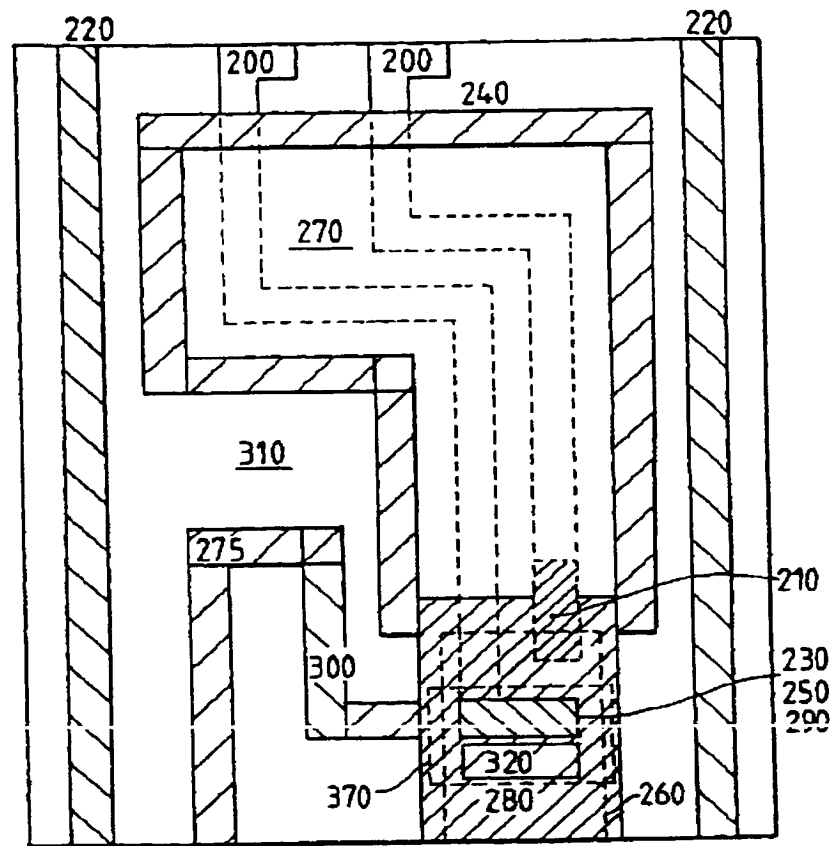


【図10】



【図11】

Fig.11.



【図12】

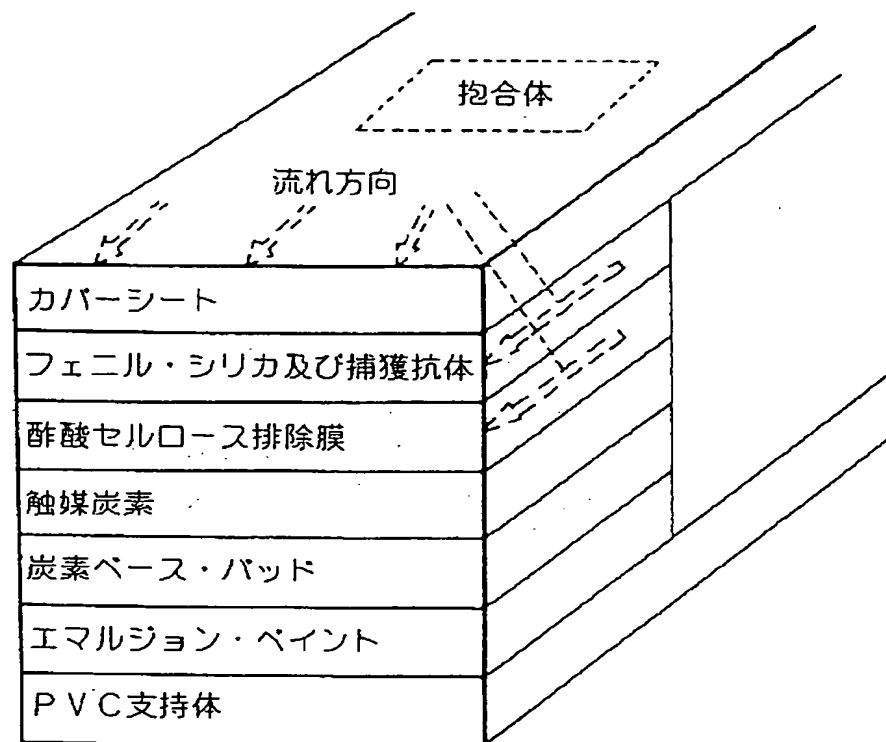


Fig.12.

【图 13】

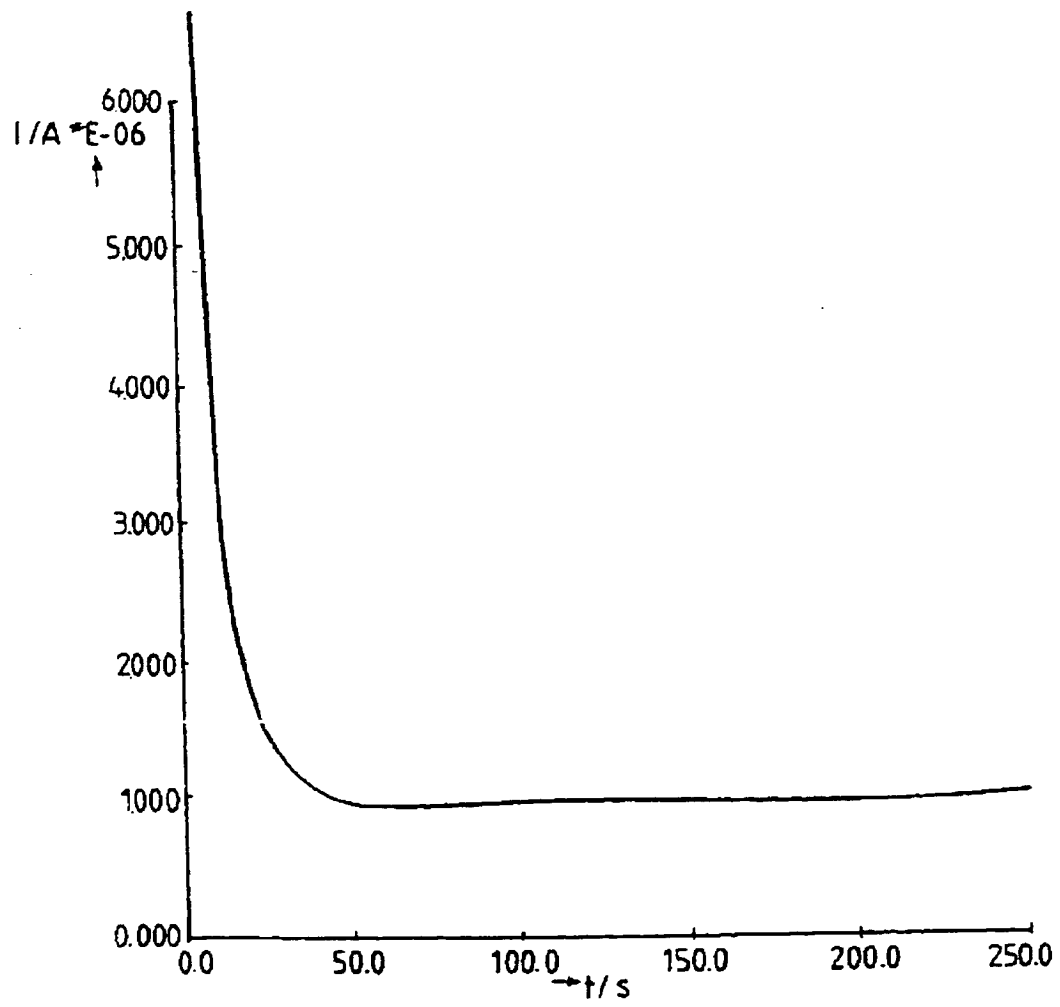


Fig.13.

【图14】

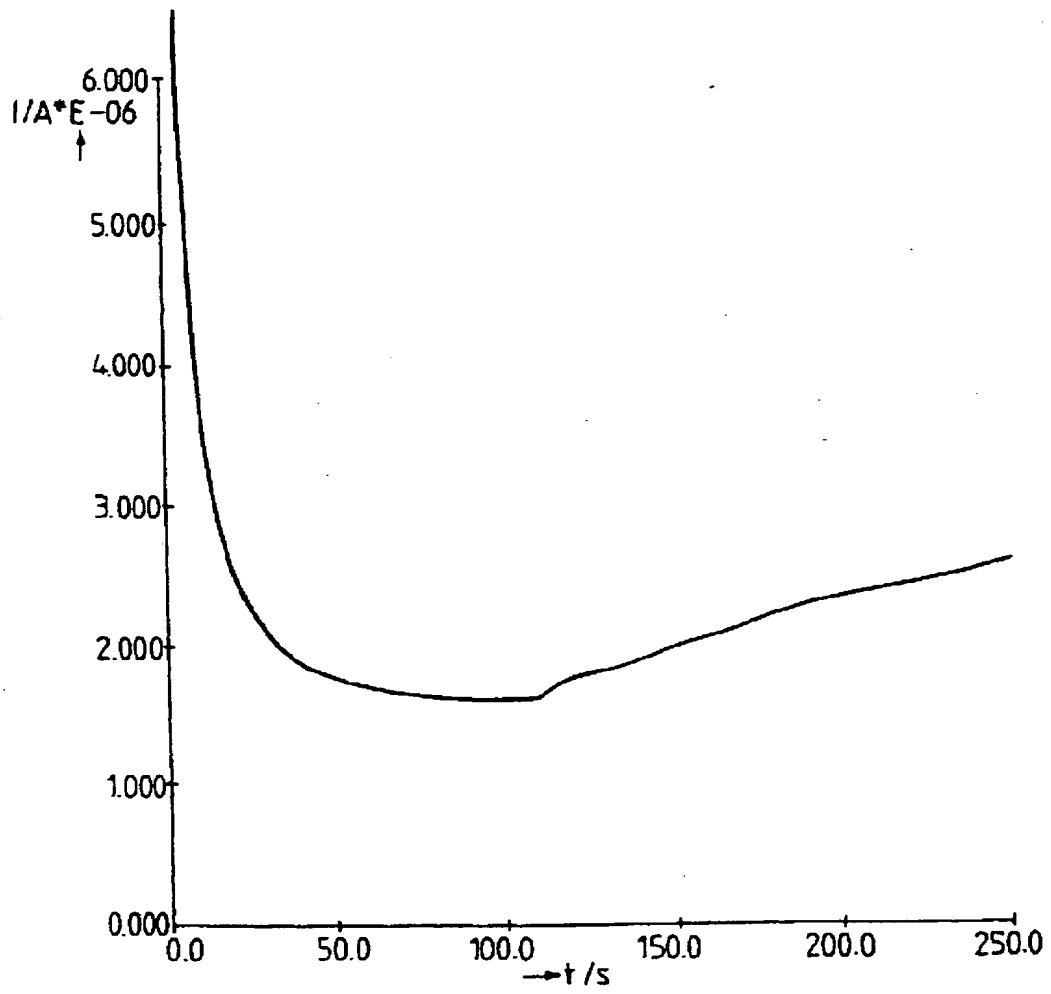


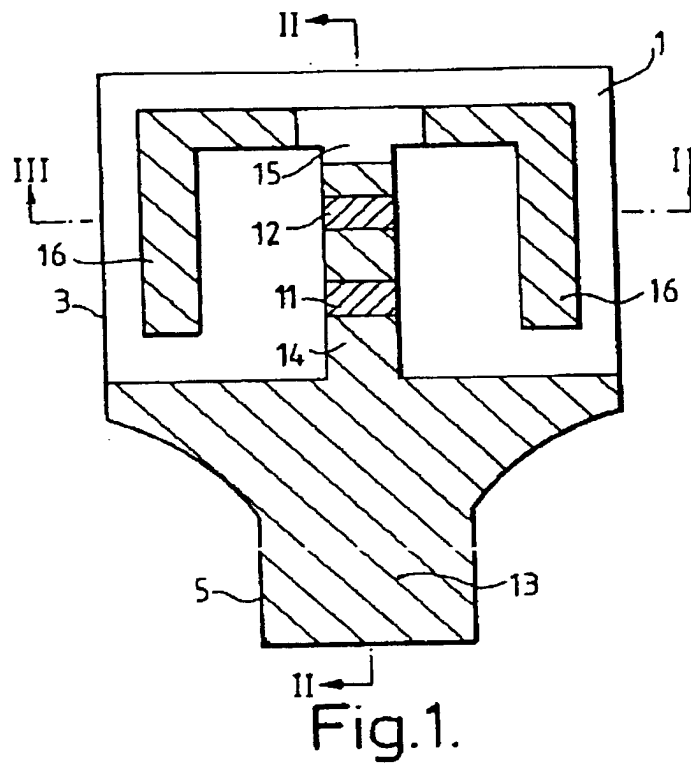
Fig.14.

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年10月3日

【補正内容】

【図1】



【図2】

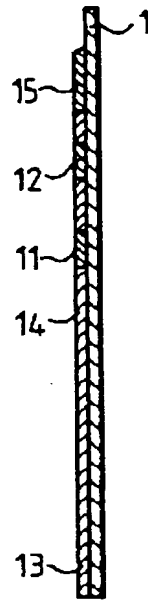


Fig. 2.

【図 3】

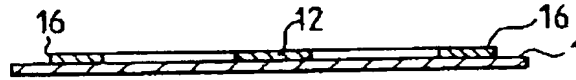


Fig. 3.

【図 4】

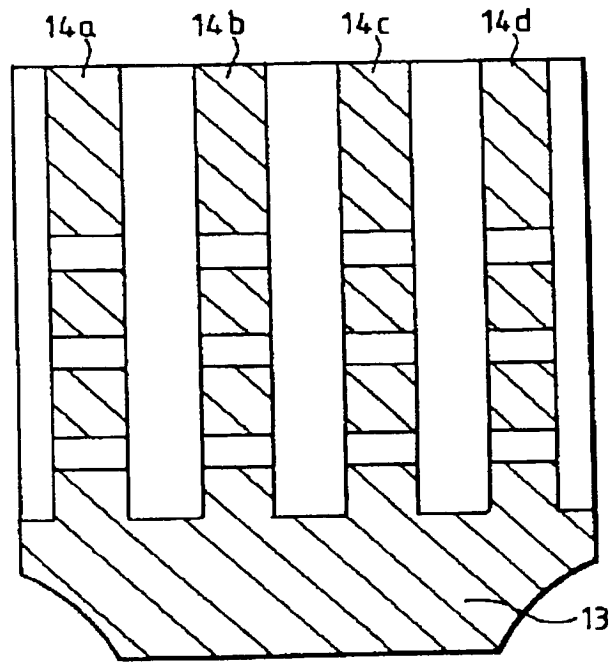


Fig.4.

【図5】

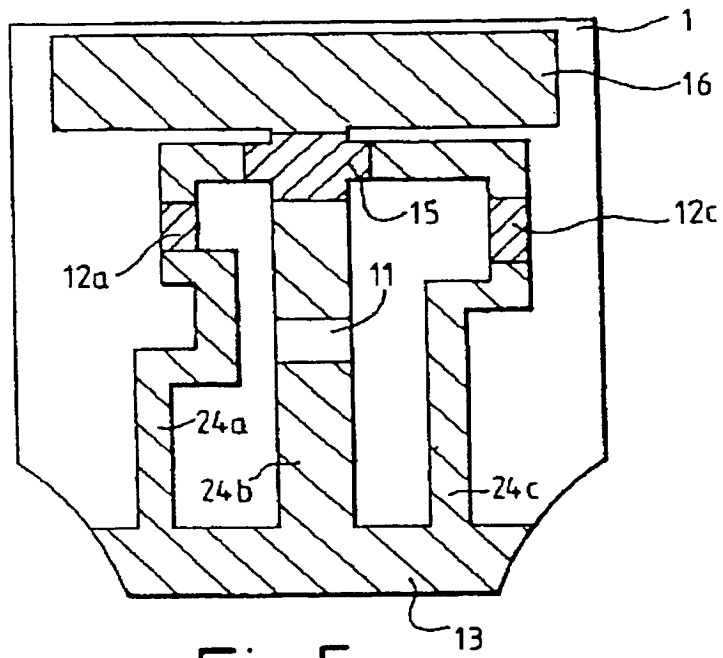
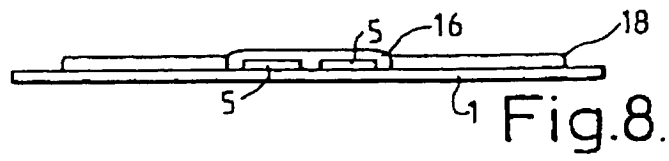
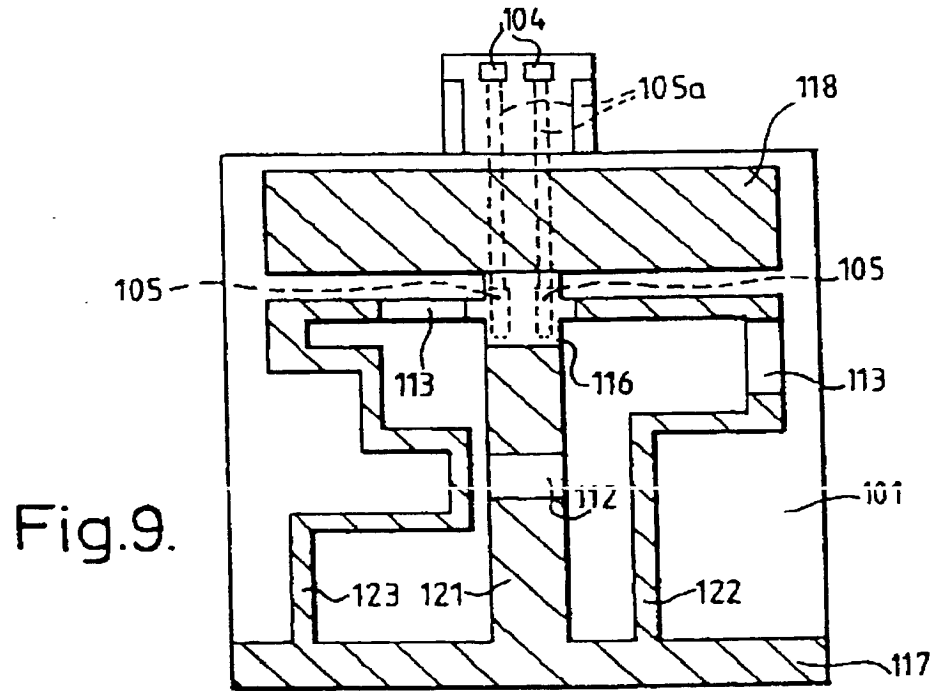


Fig.5.

【図6】



【図 9】



【図 1 0】

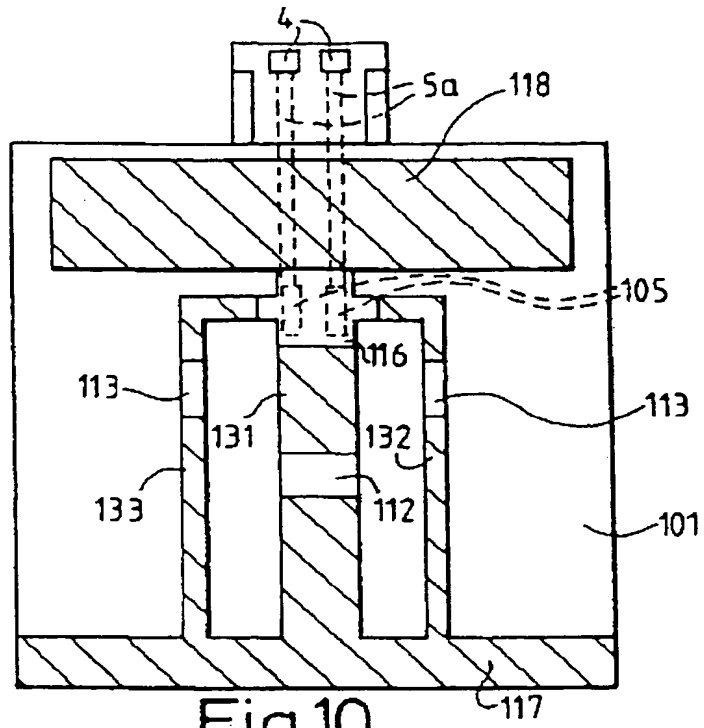
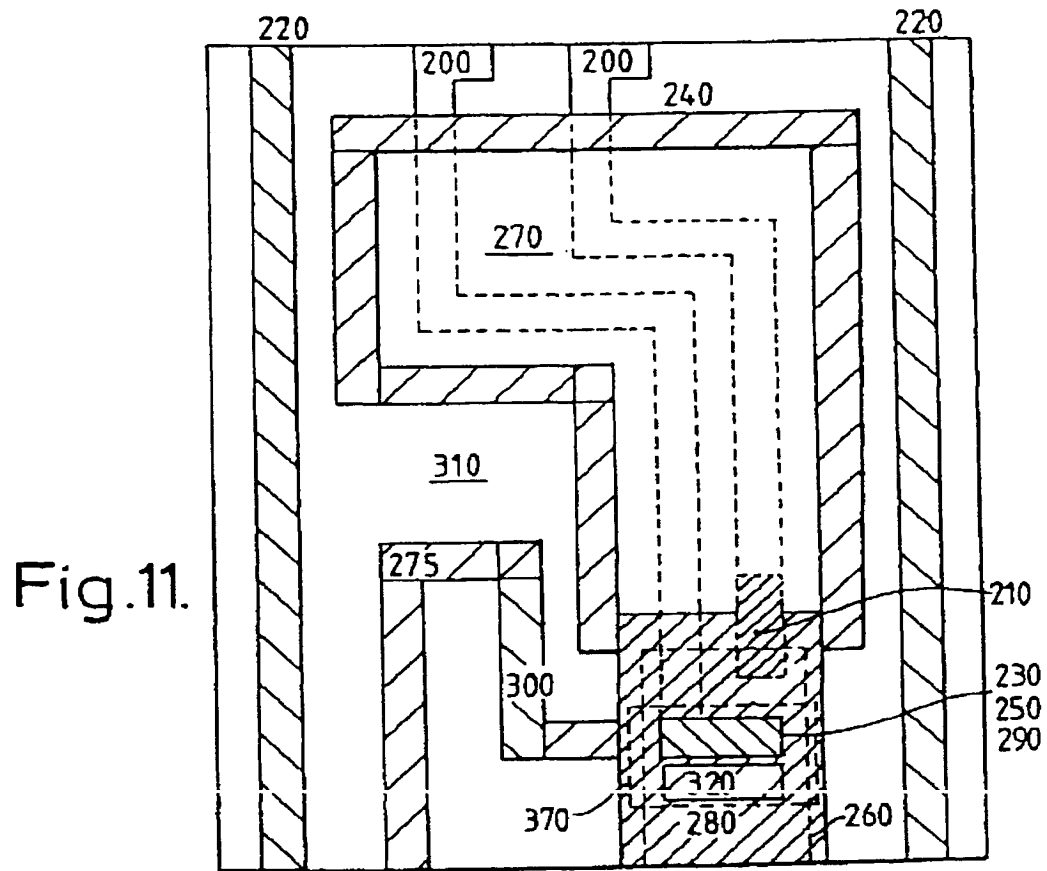


Fig.10.

【図11】



【図 12】

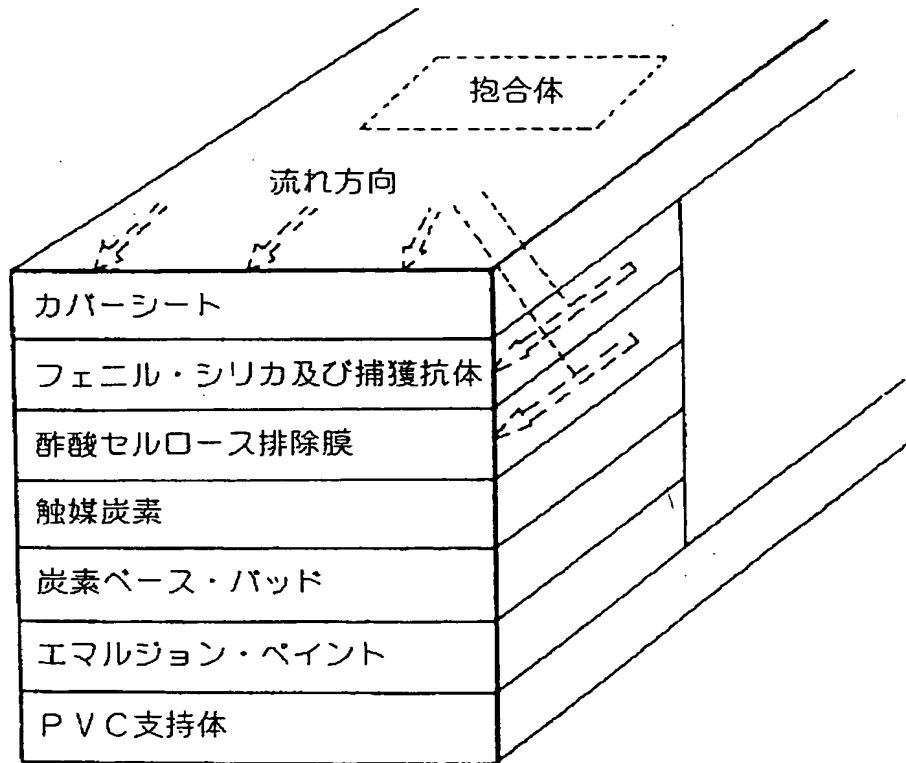


Fig.12.

【図13】

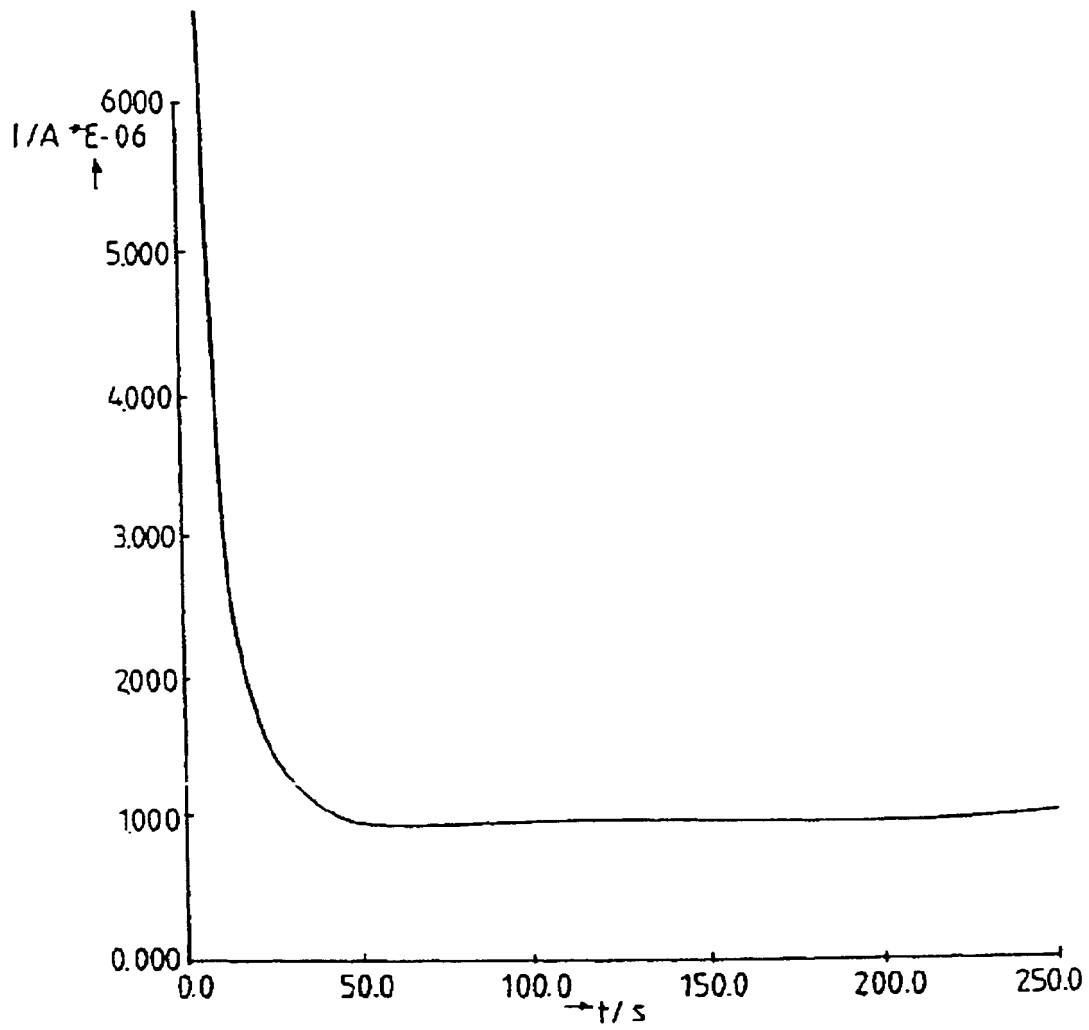


Fig.13.

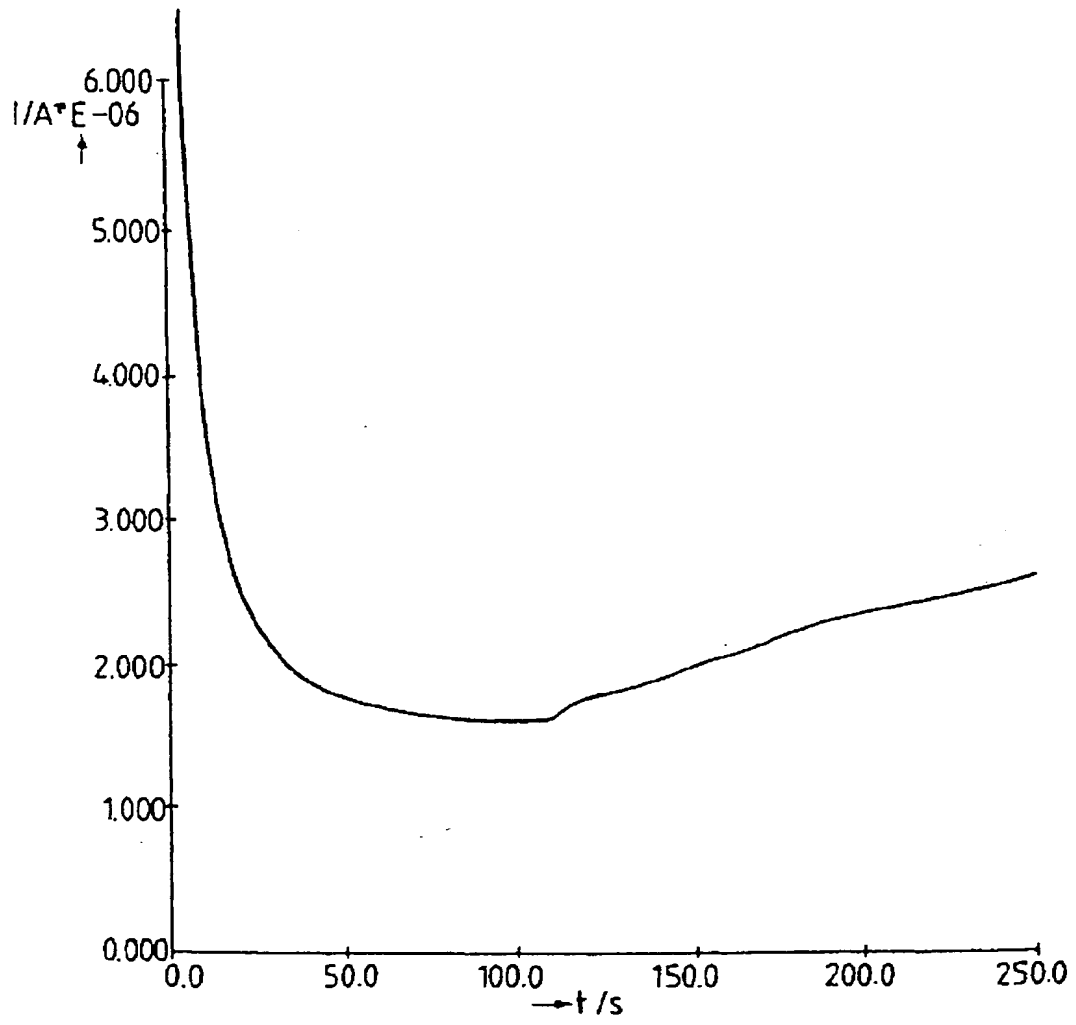


Fig.14.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 95/00723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N30/92 B01L3/00 G01N27/30		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 B01L G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,3 667 607 (BRANDT) 6 June 1972 see column 1, line 49 - column 2, line 21; figures see column 4, line 20 - line 24 see column 4, line 56 - line 56 ---	1,29-31, 39
A	US,A,3 418 158 (PERRY) 24 December 1968 see column 1, line 49 - line 72	30,31,39
A	see column 4, line 14 - line 21	30,31
A	see column 4, line 45 - line 50 ---	39
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document, but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 December 1995		Date of mailing of the international search report 10.05.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 3818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer HOCQUET, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 95/00723

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 262 328 (ABBOTT) 6 April 1988 see column 28, line 50 - line 54 see column 29, line 13 - line 34 see column 34, line 13 - line 32	1,2
A	see column 34, line 43 - line 58 see column 38, line 22 - line 34 see column 40, line 37 - line 45 ---	3
A	ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol.249, 19 October 0, AMSTERDAM pages 263 - 269 BUNCE 'disposable analytical devices' cited in the application see page 265, column 1, line 20 - line 40; figure 2 ---	2-9
A	ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol.262, pages 13 - 17 NEWMAN ET AL. 'ink-jet printing for the fabrication of amperometric glucose biosensors' see page 14, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1 see page 13, column 2 ---	12-14,32
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol.55, . USA pages 1608 - 1610 SITTAMPALAM ET AL. 'surface-modified electrochemical detector' see page 1608, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2 see page 1609, column 1, paragraph 4 ---	30,31
A	US,A,4 790 640 (NASON) 13 December 1988 see column 4, line 24 - line 41 see column 7, line 40 - column 8, line 5 ---	2,3,6-10
X	ANALYST, vol.119, 4, GB pages 1849 - 51 WANG ET AL. 'screen printed glucose strip'	1
A	see page 1849, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 4 ---	12
A	WO,A,93 15404 (ACTIMED) 5 August 1993 see page 2, line 3 - line 8 see page 5, line 8 - line 29 -----	1,29,36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 95/00723

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-39
2. Claims 40-51
3. Claims 52-61
4. Claims 62-75

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-39

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 95/00723

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-3667607	06-06-72	AU-B- 455388	21-11-74
		AU-B- 3593771	24-05-73
		BE-A- 775586	16-03-72
		CA-A- 944180	26-03-74
		CH-A- 579274	31-08-76
		DE-A- 2158491	29-06-72
		FR-A- 2116063	07-07-72
		GB-A- 1323390	11-07-73
		NL-A- 7115503	30-05-72
		SE-B- 373948	17-02-75
US-A-3418158	24-12-68	BE-A- 665592	18-10-65
		DE-A- 1598382	27-08-70
		FR-A- 1411722	22-12-65
		GB-A- 1109351	
		NL-A- 6507683	20-12-65
EP-A-0262328	06-04-88	US-A- 4960691	02-10-90
		AU-B- 598871	05-07-90
		AU-B- 7903187	31-03-88
		CA-A- 1303493	16-06-92
		DE-A- 3783845	11-03-93
		JP-B- 7036017	19-04-95
		JP-A- 63096559	27-04-88
		US-A- 5310650	10-05-94
US-A-4790640	13-12-88	NONE	
WO-A-9315404	05-08-93	AU-B- 3476493	01-09-93
		CA-A- 2128517	05-08-93
		EP-A- 0643837	22-03-95
		US-A- 5411858	02-05-95

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

- (72)発明者 ホワイト, スティーブン
イギリス国, ベッドフォード エムケー42
8ティーアール, ケンプストン, ノーマンディー クローズ 23
- (72)発明者 ターナー, アンソニー
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー16 9エイチエイチ, ノース クローリー, ブルック エンド 8
- (72)発明者 セットフォード, スティーブン
イギリス国, バッキンガムシャー エスエル7 2エヌゼット, マーロウ, バーナーズ ヒル 50, シー/オー ティー. ジェイ. セットフォード
- (72)発明者 トーシル, イブティサム
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー43 0エイチエー, クランフィールド, ベッドフォード ロード, スリフト ビュー 4
- (72)発明者 ディックス, ジョン
イギリス国, バッキンガムシャー エムケー16 0ジェイイー, ニューポート パグネル, マウントフィールド クローズ 8
- (72)発明者 スティーブンス, セーラ
イギリス国, コンベントリー シーブイ3 1エービー, ストーク, ボリングブローク ロード 67
- (72)発明者 ホール, ジェニファー
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー43 0ビービー, クランフィールド, パートリッジ ピース 4
- (72)発明者 ワーナー, フィリップ
イギリス国, ミルトン ケインズ エムケー125エイチジー, ウォルバートン, ピクトリア ストリート 15